

ÉCOLE DOCTORALE

SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Laboratoire d'Immunologie et de Neurogénétique Expérimentales
et Moléculaires (INEM) UMR7355 – CNRS – Université d'Orléans

THÈSE présentée par :

Fahima MADOURI

Soutenue le : **6 novembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline Biologie des sciences du Vivant / Immunologie

**Asthme allergique induit par un allergène
d'acarien, House Dust Mite (HDM) : rôles de
la caspase-1 et de la Protéine Kinase C
thêta (PKC- θ)**

THÈSE dirigée par :

Bernhard RYFFEL
Dieudonnée TOGBE

Directeur de recherche, HDR, UMR7355, Orléans
Chef de projet société Artimmune SAS, HDR

RAPPORTEURS :

Lionel APETOH
François TROTTEIN

Chargé de recherche, HDR, INSERM U866, Dijon
Directeur de recherche, HDR, INSERM U1019, Lille

JURY :

Lionel APETOH
François ERARD
Nelly FROSSARD
Nathalie HEUZE VOURC'H
Laurent MASCARELL
Bernhard RYFFEL
Dieudonnée TOGBE

Chargé de recherche, HDR, INSERM U866, Dijon
Professeur de l'Université d'Orléans (Président du jury)
Directeur de recherche, HDR, UMR-7200, Strasbourg
Chargée de recherche, UFR de Médecine, Tours
Responsable immunologie mucoale, Stallergenes, Antony
Directeur de recherche, HDR, UMR-7355, Orléans
Chef de projet société Artimmune SAS, HDR

REMERCIEMENTS

C'est avec une certaine nostalgie et un noeud à la gorge que je rédige cette partie que j'avais gardé pour la fin même si elle se trouve au début de ce manuscrit. Car c'est au moment où on « remercie » qu'on sent que l'aventure prend fin...

Les premiers remerciements que j'adresse sont pour tous les membres de mon jury de thèse, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de prendre le temps de juger mon travail. Ainsi, je remercie vivement le Docteur Lionel Apetoh et le Docteur François Trottein pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Docteur Laurent Mascarell, le Docteur Nathalie Heuzé Vourc'h et le Docteur Nelly Frossard de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Je remercie chaleureusement le Docteur Bernhard Ryffel, mon directeur de thèse, pour ses idées, son soutien, pour tous les échanges que nous avons eu afin de faire avancer mes projets de thèse. Merci d'avoir grandement contribué à la rédaction de mes articles.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Dieudonnée Togbe, sans qui cette thèse n'aurait pu se faire. Merci pour le soutien que tu m'as apporté, pour tes conseils et tout ce que tu as fait pour moi. Merci de m'avoir consacré tout ce temps, de m'avoir épaulé pour les manipes, les articles, mon manuscrit et bien d'autres choses. Ton aide fut précieuse et indéniable.

J'aimerais également remercier le Docteur Valérie Quesniaux de m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire qui fut ma deuxième maison pendant 3 ans. Merci pour vos conseils sur mes projets, mes articles et sur mon manuscrit.

Je n'oublie pas de remercier le Professeur François Erard, grâce à qui j'ai obtenu cette thèse. Merci de m'avoir envoyé ce message qui a changé ma vie en me proposant de faire une thèse au laboratoire INEM, vous êtes un très bon recruteur !

Je remercie également Fabrice Trovero de m'avoir accepté au sein d'Artimmune. Je remercie également Corinne Halgrain.

Je remercie de tout mon cœur mon équipe, Artimmune.

- Merci Tiffounette, pour ton soutien moral à toute épreuve. Tu es une amie toujours présente!

- Merci Loulou le Louis, on peut toujours compter sur toi, tu es le cœur d'Artimmune ! Et surtout si tu arrive à savoir « What does the fox say ? » tu me fais signe !
- Merci Aurélie Ledure, d'avoir toujours été gentille et à l'écoute. On est arrivées quasiment en même temps et ce fut un plaisir d'être formée en même temps que toi. Tu vas beaucoup me manquer aussi !
- Merci Nathalie Rouxel, tu n'as pas de surnom mais une intonation dans la prononciation ! Tu as été la première personne à m'avoir accueilli et ça compte beaucoup !
- Merci à Chloé qui vient juste d'arriver en thèse et qui reprend le flambeau. Dommage que tu arrive au moment où je pars car tu es une fille adorable avec qui je me suis tout de suite entendue !

Sans oublier Marieke qui est partie mais qui était là à mes débuts. Merci à tous d'avoir participé à mes manipes, merci pour toutes ces journées pléthysmo et FACS interminables et les pétages de cables, les chansons et les fous rires qui vont avec ! Vous étiez toujours présent à mes côtés et je ne l'oublierais jamais.

Je remercie de tout mon coeur ma petite Paupau L'haricot, mon binôme de choc ! Merci de ton aide précieuse et pour les fous rires de tous les instants. Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés, ça va beaucoup me manquer.

Un énorme merci à tous les membres de l'INEM: merci à Nono et Lulu Castagnette (Merci pour votre soutien, vous êtes adorables), Manounou, Noria, Léa (Vous êtes géniales les filles, restez comme vous êtes ! Et n'oubliez pas : Gloire aux vernis, que votre nom soit Top Coaté !), ma Coco (Tu m'as bien fait rire ma voisine ! Surtout arrête les tomates et les andouillettes quand je serais partie !), Flo (Merci pour toutes les discussions sur mon avenir et les gâteaux bijoux !), Stef (Merci pour ta gentillesse et de m'accueillir dans ton bureau !), Marc, Isabelle, Isaz, Beb, Auré, Aurélie.M, Julie, Flora, Jennif, Marie-Laure, Anne-Gaëlle, Seb, Catherine, Rafiou. Merci à vous tous et bonne chance pour la suite ! Merci également à Nadège, Bernadette et Anne : sans vous le labo ne tournerait pas rond !

Je n'oublie pas de remercier les neuros, les membres du CDTA et les animaliers. En particulier Alex, Jérôme et Ludo de la zone 6. C'était un vrai plaisir de monter en zone, de rire avec vous, de barbouiller votre tableau de dessin et de découvrir le nouveau surnom du jour ! Merci également à Amé pour ta bonne humeur, promis j'irais toujours voter !

Je remercie certaines personnes qui ont fait un passage plus ou moins bref mais qui m'ont beaucoup apporté, à savoir les étudiants étrangers (Changwei, Quianghui, Jolanta, Mateja) et les stagiaires (Fabien, Laurie, Camille, Dalila, Anthony...). Un merci à une de mes stagiaires Laura, avec qui j'ai passé des moments mémorables, qui m'a bien aidée à la fin de ma thèse et qui j'espère ira très loin!

Enfin le plus grand, le plus important des mercis va aux personnes que j'aime le plus au monde : mon Papa Coeur et ma Maman Coeur. Vous êtes les meilleurs parents que l'on puisse rêver d'avoir. Vous m'avez permis de faire les études que je voulais et toujours soutenu dans mes choix. Merci de m'avoir supportée, de m'avoir épaulée, rassurée toutes les fois où je doutais de moi. Je remercie également mes sœurs adorées pour les mêmes raisons, vous êtes indispensables à ma vie et tout ce chemin parcouru n'aurait été possible sans vous! Une pensée à nos petites bêtes adorées : ma petite puce Choupette qui nous a quittés trop tôt et que j'aurais aimé prendre dans mes bras plus d'une fois quand ça n'allait pas, mais Gina était là...

Et pour finir, je remercie les personnages principaux de cette thèse, les petites souris. On ne vous remerciera jamais assez...

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
ABBREVIATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	4
INTRODUCTION.....	7
I) GENERALITES SUR L'ASTHME ALLERGIQUE.....	7
1.1) Description de l'asthme allergique	7
1.2) Implication de l'asthme dans l'Histoire de l'Homme	7
1.3) Données épidémiologiques : l'asthme dans le monde	8
II) LES FACTEURS DECLENCHANT L'ASTHME	9
2.1) L'influence génétique sur l'asthme.....	9
2.2) L'influence de l'environnement sur l'asthme	12
2.3) Les facteurs aggravants l'asthme	13
III) PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME ALLERGIQUE	14
3.1) La phase d'immunisation	14
3.2) La phase effectrice	17
3.2.1) La réaction d'asthme immédiate ou précoce	17
3.2.2) La réaction d'asthme tardive	19
3.3) La phase de remodelage bronchique.....	20
IV) LES PRR, SENSEURS DE L'IMMUNITE INNEE.....	21
4.1) Les TLR (Toll-Like Receptors)	21
4.2) Les NLR (Nod-Like Receptors)	24
4.3) Les CLR (C-type Lectin Receptors)	25
4.4) Les PAR (Proteases-Activated Receptors)	26
V) LES MEDiateurs CELLULAIRES DE L'ASTHME ALLERGIQUE.....	27
5.1) Les cellules épithéliales	28
5.2) Les cellules dendritiques	28
5.3) Les macrophages	32
5.4) Les lymphocytes.....	36
5.4.1) Les lymphocytes B.....	37
5.4.2) Les lymphocytes T régulateurs (Treg)	38
5.4.3) Les lymphocytes T helper (Th1, Th2).....	40
5.4.4) Les lymphocytes T helper (Th9, Th17, Th22)	42
5.4.5) Les Natural Killer (NK)	45

5.5)	Les éosinophiles.....	46
5.6)	Les ILC (Innate Lymphoid Cells)	48
VI)	LES MEDiateurs CYTOKINIQUES DE L'ASTHME ALLERGIQUE	51
6.1)	IL-4, IL-5 et IL-13	52
6.2)	IL-25, IL-33 et TSLP	55
6.2.1)	L'interleukine-25.....	55
6.2.2)	L'interleukine-33.....	55
6.2.3)	Le TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin)	60
6.3)	IL-1 α , IL-1 β , IL-18.....	61
6.4)	Les chimiokines	65
VII)	LES POUMONS, CIBLES DES ALLERGENES	67
7.1)	L'architecture pulmonaire.....	67
7.2)	Le mucus, protection contre les allergènes.....	67
7.3)	Le microbiome pulmonaire, aire biotique du microbiote	68
VIII)	LES MODELES D'ASTHME ALLERGIQUE CHEZ LA SOURIS	69
8.1)	Le modèle ovalbumine (OVA)	69
8.2)	Le modèle House Dust Mite (HDM)	71
8.3)	Le modèle papaïne (PAP).....	72
8.4)	Le modèle pollen de bouleau (BP, birch pollen).....	73
OBJECTIFS		74
RESULTATS.....		77
<p><u>1^{ère} partie (Article 1):</u> L'activation de la caspase-1 par l'inflammasome NLRP3 inhibe l'inflammation pulmonaire dépendante de l'IL-33 induite par l'allergène d'acarien HDM (House Dust Mite)</p> <p>Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33 dependent house dust mite induced allergic lung inflammation.....</p>		
<p><u>2^{ème} partie (Article 2):</u> La protéine kinase C θ contrôle la réponse Th2 à l'allergène d'acarien House Dust Mite (HDM) en inhibant la signalisation NFAT-1 et IRF4.</p> <p>PKC θ controls Th2 responses to house dust mite allergen by inhibiting NFAT1 and IRF4 signaling.....</p>		
DISCUSSION.....		196
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		211
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		214
ANNEXES.....		226

ANNEXE 1: TSLP, une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'asthme allergique (Revue 1).....	237
---	------------

ANNEXE 2: Thymic Stromal Lymphopoietin Enhances Th2/Th22 and Reduces IL-17A in Protease-Allergen-Induced Airways Inflammation (Article 3).....	232
--	------------

ABBREVIATIONS

AAM	Alternatively Activated Macrophages
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease domain
ADN	Acid DésoxyriboNucléique
AHR	Airway Hyper-Reactivity
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ARN	Acid RiboNucléique
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein
ATP	Adenosine TriPhosphate
BCL-10	B Cell Lymphoma 10
BCR	B Cell Receptor
BIR	Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat
BMDM	Bone Marrow Derived Macrophages
BP	Birch Pollen
Breg	Lymphocyte B régulateur
C20	Compound 20
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CARMA-1	Caspase Recruitment Domain CARD, Membrane-Associated guanylate kinase, MAGUK, protein 1
Caspase	CysteinyI-aspartate-cleaving protease
CCL	Chemokine Ligand
CCR	Chemokine (CC-motif) Receptor
CLR	C-type Lectin Receptor
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRD	Carbohydrate-Recognition Domain
CREB	cAMP Response Element-Binding protein
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DC	Dendritic Cells
Der f	<i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
EPO	Eosinophil PerOxydase
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FLG	Filaggrin
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte Colony Stimulatory Factor
GPCR	G Protein Coupled Receptor
GWAS	Genome Wide Association Studies
HDM	House Dust Mite
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
ICE	Interleukin-1-Converting Enzyme
ICOS	Inducible Co-Stimulatory molecule

ID2+	Inhibitor of DNA Binding 2
IFN	Interferon
IgE	Immunoglobuline E
IgG	Immunoglobuline G
IKDC	Interferon Producing Killer Dendritic Cell
IL-	Interleukine-
IL-1RAcP	IL-1 R accessory protein
ILC	Innate Lymphoid Cell
iNKT	invariant Natural Killer T
IRF	Interferon Regulatory Factor
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
JAK	Janus Kinase
JNK	C-Jun N-terminal Kinase
KO	Knock-Out
LPS	LipoPolySaccharide
LRR	Leucine-Rich Repeat
LTA	Lymphotoxin alpha
LTi	Lymphoid Tissue-Inducer
MAGUK	Membrane-Associated GUanylate Kinase
MALT-1	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation gene-1
MAP Kinase	Mitogen-activated protein kinase
MCP-	Macrophage Chemotactic Factor-
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MDSC	Myeloid-Derived-Suppressor Cell
MIP-α	Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MUC	Mucine
NBD	Nucleotide-Binding-Domain
NCR	Natural Cytotoxicity Triggering Receptor
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B
NF-HEV	Nuclear Factor from High Endothelial Venules
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
NOD	Nod Like Receptor
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OVA	Ovalbumine
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PAP	Papaïne
PAR	Protease-Activated Receptor
PGD2	ProstaGlandin D2
PGI2	ProstaGLandin I2
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKC	Protein Kinase C
PLC	PhosphoLipase C
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PRR	Pathogen Recognition Receptor
PTGER	Prostaglandine Receptor

PYD	PYrin Domain
Rag	Recombinant-activating genes
RORγt	RAR-related Orphan Receptor gamma t
ROS	Reactive Oxygen Species
SIGIRR	Single Ig IL-1R-Related molecule
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
sST2	soluble ST2
SH2	SRC Homology 2
ST2L	ST2 transmembranaire
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Syk	Spleen tYrosine Kinase
TCR	T Cell Receptor
TGF-β	Transforming growth factor beta
Th	Lymphocyte T helper
THP1	Human acute monocytic leukemia cell line
TIMP	metallopeptidase inhibitor
TIR	Toll/Interleukine-1 Receptor
TIRAP	TIR domain containing Adaptor Protein
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
Treg	Lymphocyte T régulateur
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin
TYK	TYrosine Kinase
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
ZO-1	Zonula-Occludine-1
α-GalCer	alpha-Galactosylceramide

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I : Gènes de susceptibilité associés à l'asthme allergique

Tableau II : Tableau récapitulatif des membres de la famille de l'IL-1 avec les différentes nomenclatures ainsi que leur propriété

Figure 1: Voies de signalisation majeures impliquées dans l'asthme et gènes de susceptibilité associés à l'asthme.

Figure 2: Sensibilisation des voies respiratoires par un allergène.

Figure 3: Première sensibilisation des voies respiratoires et induction de la réponse asthmatique allergique

Figure 4: Effet des lymphocytes Treg dans la suppression des voies de signalisation pro-inflammatoires dans la réponse à l'allergène.

Figure 5: Représentation schématique de la cascade inflammatoire dans l'asthme allergique.

Figure 6: Représentation schématique des deux principales phases effectrices de l'asthme allergique : la phase précoce et la phase tardive.

Figure 7: Représentation schématique d'une bronche normale (à gauche) et d'une bronche ayant subi un remodelage (à droite).

Figure 8: Schéma simplifié des voies de signalisation des PRR.

Figure 9: Mécanisme d'activation de la réponse immunitaire dans le cadre de l'asthme allergique induit par l'allergène d'acarien HDM (house dust mite).

Figure 10: Organisation structurale des inflammasomes.

Figure 11: Activation des cellules de l'immunité innée par l'allergène HDM.

Figure 12: Représentation schématique du lien entre les cellules épithéliales et les cellules dendritiques.

Figure 13: Sous population de cellules dendritiques dans le poumon sous condition homéostatique d'une part et sous condition inflammatoire d'autre part.

Figure 14: Représentation schématique de l'activation des cellules dendritiques.

Figure 15: Représentation de la synapse immunologique entre les DC et les cellules T et leurs marqueurs de co-stimulation.

Figure 16: Classification de population de macrophage.

Figure 17: Classification des macrophages selon leur phénotype fonctionnel.

Figure 18: Différentes voies de signalisation permettent la polarisation des macrophages en M1 ou M2.

Figure 19: Immunoglobuline E produite par les lymphocytes B (forme membranaire) et les plasmocytes (forme sécrétée).

Figure 20: Populations de lymphocyte B régulateurs (B10, Br3, Breg).

Figure 21: Populations de lymphocyte T régulateurs (Tr1, Th3, Treg).

Figure 22: Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocyte Th1 ou Th2

Figure 23: Diversité des cellules Th2 mémoires.

Figure 24: Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocyte Th17 durant la phase effectrice de la réponse allergique.

Figure 25: Schéma récapitulatif de la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocytes Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 ou Treg.

Figure 26: Fonctions des iNKT dans l'hyperréactivité bronchique.

Figure 27: Cytokines Th2 impliquées dans la maturation et le recrutement des éosinophiles.

Figure 28: Classification des ILC en trois groupes selon leurs caractéristiques fonctionnelles.

Figure 29: Voie de signalisation de l'asthme dépendant de l'axe IL-33/ST2 et des ILC2.

Figure 30: Schéma représentant les différents récepteurs de l'IL-4 et l'IL-13

Figure 31: Réponse immunitaire Th2 dans les voies respiratoires des patients asthmatiques

Figure 32: Schéma représentant la cascade de signalisation impliquant le récepteur de l'IL-5.

Figure 33: Libération de l'IL-33, fixation sur son récepteur ST2 et voies de signalisation induites.

Figure 34: Représentation schématique de la structure de l'IL-33

Figure 35: Représentation schématique de la structure de l'IL-33 et de ces sites de clivages

Figure 36: Représentation schématique de la sécrétion d'IL-33 et des mécanismes permettant sa maturation.

Figure 37: Représentation schématique de l'implication de l'IL-33 dans l'asthme.

Figure 38: Représentation schématique de l'action synergique entre l'IL-25, l'IL-33 et TSLP

Figure 39: Représentation schématique des ligands et récepteurs de la famille de l'IL-1.

Figure 40: Représentation schématique des structures de l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-18 et leurs sites de clivages.

Figure 41: Représentation schématique de l'activation de l'IL-1 β .

Figure 42: Tableau récapitulatif de quelques chimiokines les plus représentatives des groupes CC et CXC

Figure 43: Modèle expérimental murin d'inflammation pulmonaire induite par l'ovalbumine (OVA) utilisé à l'Institut.

Figure 44: Modèle expérimental murin d'inflammation pulmonaire induite par House Dust Mite (HDM) utilisé à l'Institut.

Figure 45: Modèle expérimental murin d'inflammation pulmonaire induite par la papaine (PAP) utilisé à l'Institut.

Figure 46: Modèle expérimental murin d'inflammation pulmonaire induite par le pollen de bouleau (BP, birch pollen) utilisé à l'Institut.

Figure 47 : Hypothèse de voie de signalisation alternative en absence de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1 induisant la production d'IL-33 et un phénotype Th2 en réponse à HDM.

Figure 48 : Activation de NF- κ B via la voie de signalisation CARMA-1, BCL-10, MALT-1.

Figure 49 : Reconnaissance du CMHII des ILC2 et du TCR des cellules T.

Figure 50 : Schéma illustrant les hypothèses pouvant expliquer la diminution du recrutement des ILC2 en absence de PKC- θ .

INTRODUCTION

I) GENERALITES SUR L'ASTHME ALLERGIQUE

1.1) Description de l'asthme allergique

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires. Une crise d'asthme est caractérisée par des épisodes récurrents de toux, de dyspnées et des difficultés respiratoires dues au rétrécissement des parois bronchiques qui se contractent ainsi qu'à l'abondante production de mucus. Le débit d'air inspiré et expiré est réduit c'est pourquoi la respiration est sifflante et une oppression thoracique y est associée (d'après l'organisation mondiale de la santé, OMS). La crise d'asthme peut être de courte durée (de quelques minutes à quelques heures) mais peut être aussi récurrente pendant plusieurs jours. L'effet peut être réversible spontanément ou suite à un traitement bronchodilatateur.

1.2) Implication de l'asthme dans l'Histoire de l'Homme

On dit que « c'est en connaissant l'histoire que l'on peut construire le présent et apprendre l'avenir ». Remontons le temps et cherchons à en savoir plus sur l'asthme. Cette maladie s'est-elle développée dans le monde moderne? Est-elle ancienne? Nos ancêtres la connaissaient-ils?

Aussi surprenant que cela puisse paraître, la connaissance de cette pathologie par les hommes est loin d'être récente, elle est même très ancienne puisqu'elle fut décrite pour la première fois dans l'Egypte antique au XVI^{ème} siècle avant notre ère. En effet, l'un des plus anciens traités médicaux découvert à ce jour, le Georb Ebers papyrus, retrouvé en 1862 à Louxor, contenait des prescriptions écrites en hiéroglyphe, pour plus de 700 remèdes contre divers maux. L'un d'eux consistait à chauffer un mélange d'herbes sur des briques et à inhaler leurs fumées, permettant ainsi aux malades de mieux respirer.

Le terme « asthme » vient du verbe grec « aazein », qui signifie « haleter » ou « respirer par la bouche ouverte, le souffle pointu ». Ce mot vient du médecin Hippocrate de Cos et il fut employé pour la première fois dans la Grèce Antique au XIX^{ème} siècle avant Jésus Christ. Plus précisément dans l'Illiade d'Homère lorsqu'Hector, le héros de la guerre de Troie, fut étendu sur la plaine, meurtri par une atroce suffocation après avoir eu le torse transpercé par la lance d'Achilles.

Cependant, ce fut le maître clinicien grec, Arétée de Cappadoce, qui donna la première description clinique de la pathologie. Il décrivit ainsi l'asthme comme une crise d'étouffement et « une soif d'air inextinguible ».

De plus, il y a quelques centaines d'années, en Chine, on donnait aux asthmatiques un mélange d'herbe contenant de l'éphédrine à partir desquelles ils inhalaient les bêta-agonistes qui réduisaient la broncho-constriction.

Plus récemment, au début du XXème siècle, l'asthme fut considéré comme une maladie psychosomatique, ce qui ralentit grandement les progrès de la médecine concernant cette pathologie. Le traitement préconisé était la psychanalyse ou encore d'autres « remèdes parlés ». Les psychanalystes traitaient les asthmatiques comme des personnes souffrant de dépression. Fort heureusement, cette théorie psychologique fut réfutée et l'asthme considéré comme un réel état physique.

Finalement, ce fut en 1960 que l'asthme fut reconnu comme une maladie inflammatoire, lorsque des médicaments anti-inflammatoires furent utilisés.

1.3) Données épidémiologiques : l'asthme à travers le monde

Depuis 20 ans, la prévalence de l'asthme en France et dans le monde n'a cessé d'augmenter, allant même jusqu'à doubler. Plus de 235 millions de personnes en sont affectées, selon les dernières données de l'organisation mondiale de la santé (OMS) publiées en 2014 et environ 225 000 personnes en meurent chaque année. La plupart des décès qui lui sont imputables surviennent dans les pays à faibles revenus ou aux revenus intermédiaires.

En France, l'asthme touche 3,5 millions de personnes dont un tiers a moins de quinze ans. En effet, la prévalence de l'asthme chez l'enfant fut estimée à 9% en 2009 (Delmas and Fuhrman 2010). Cette maladie étant la première cause d'absentéisme à l'école et la plus fréquente dans les admissions en service pédiatrique, elle constitue un réel problème de santé publique.

Le coût de l'asthme a fait l'objet de nombreuses études. En France, le coût annuel de l'asthme est estimé à 1,5 milliard d'euros, tandis qu'aux Etats-Unis, cette estimation monte à 5,1 milliard de dollars de coûts directs. Les principaux déterminants de ce coût sont la sévérité et le contrôle de la maladie. Un asthme sévère nécessite une quantité de soins élevée et un recours à un pneumologue ou à l'hospitalisation assez fréquent. En France le coût d'une hospitalisation d'un patient asthmatique de moins de 70 ans s'élève à 1900 euros et peut atteindre 3500 euros en cas de comorbidité associée. De plus, la part relative des coûts indirects (absentéisme à l'école ou au travail) reste importante chez les asthmatiques sévères.

Diverses recommandations furent établies par les services publics pour diminuer ce coût, notamment la qualité des programmes d'éducation pour la santé. Ceci ayant eu pour conséquence de diminuer de façon significative le nombre d'hospitalisations, les passages aux urgences et l'absentéisme professionnel et scolaire. Les campagnes d'informations organisées par des associations comme « Asthme et Allergies » et la journée mondiale de

l'asthme permettent de mieux informer les personnes sur cette maladie. Des brochures mises à disposition du grand public sont développées par des groupes comme Stallergenes.

De plus, les comorbidités (sinusite, reflux gastro-oesophagien, infections respiratoires, affections dermatologiques) associées à l'asthme sont à présent mieux prises en charge.

II) LES FACTEURS DECLENCHANT L'ASTHME

L'asthme est une maladie dite plurifactorielle (Lötvall, Akdis et al. 2011). Les patients peuvent avoir des prédispositions génétiques à la maladie auxquelles s'ajoutent des facteurs environnementaux ou aggravants comme des causes hormonales ou la pollution atmosphérique. L'asthme résulte donc de l'interaction de plusieurs gènes et de stimuli environnementaux.

2.1) L'influence génétique sur l'asthme

Il a été montré que les parents au premier degré de patients souffrant d'asthme ont 5 à 6 fois plus de risques de développer la maladie (Meng and Rosenwasser 2010).

Cependant, l'observation de l'agrégation et la ségrégation de l'asthme n'ont montré aucune cohérence entre les diverses populations, suggérant l'existence d'une association complexe de facteurs génétiques et environnementaux.

Plusieurs stratégies ont été mises en place afin de déterminer les gènes de susceptibilité à l'asthme. Les gènes sensibles sont identifiés par clonage positionnel (identification de gène à travers un ensemble de marqueurs génétiques sur les chromosomes suspects), par l'approche du gène candidat (gène potentiellement impliqué dans l'asthme) ou encore par une large étude d'association du génome (Genome Wide Association Studies, GWAS) visant à identifier les variants dans le message génétique ou SNP (Single nucleotide polymorphisms). De plus, les répliques indépendantes dans diverses populations et les études fonctionnelles fournissent des preuves supplémentaires dans la confirmation de l'identification de ces gènes.

Des puces contenant des centaines de milliers de variants génétiques communs ont été utilisées dans les études d'association du génome (GWAS) référencées dans le catalogue de l'Institut national de recherche du génome humain. Ces études ont mis en évidence la présence de loci liés à l'asthme ou à des gènes de proximité.

Les gènes de susceptibilité à l'asthme ont été répartis en quatre groupes (**Figure 1 et tableau I**) (Vercelli 2008) :

Groupe I : Gènes associés à l'immunité innée et à l'immunorégulation. Ce groupe inclut :

- les gènes codant pour les PRR (Pathogen recognition receptor) tels que CD14, des récepteurs TLR (Toll-Like Receptor) comme TLR2, TLR4, TLR6, TLR10, des récepteurs NOD comme NOD1 et NOD2
- les cytokines immunorégulatrices comme IL-10, TGF- β 1
- le facteur de transcription STAT3
- les molécules impliquées dans la présentation de l'antigène (allèles HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP)
- le récepteur de prostaglandine PTGER2.

Groupe II : Gènes associés à la différenciation des Th2 et aux fonctions effectrices tels que IL-4, IL-13, IL-4R.

Groupe III : Gènes associés à la biologie des cellules épithéliales et à l'immunité muqueuse. Ce groupe inclut :

- les chimiokines telles que CCL5, CCL11, CCL24 et CCL26
- les peptides antimicrobiens
- les facteurs impliqués dans la maintenance de l'intégrité de la barrière des cellules épithéliales tels qu'ADAM 33 et FLG

Groupe IV : Gènes associés aux fonctions pulmonaires et au remodelage bronchique tels que TNF- α ou TGF- β 1.

Gènes	Locus	Nom officiel	Fonction biologique
Groupe I			
CD14	5q31.1	CD14 molecule	Immunité innée, reconnaissance microbienne
IL-10	1q31-q32	Interleukin 10	Immunorégulation
TLR2	4q32	Toll-like receptor-like 2	Immunité innée, reconnaissance microbienne
TLR4	9q33.1	Toll-like receptor 4	Immunité innée, reconnaissance microbienne
Groupe II			
IL-4	5q31.1	Interleukin 4	Effecteur dans la différenciation des lymphocytes Th2 et dans l'induction des IgE
IL-13	5q31	Interleukin 13	Effecteur dans la différenciation des Th2, hyper réactivité bronchique
STAT6	12q13	Signal transducer and activator of transcription 6	Signalisation de l'IL-4 et -13
FcεRI	11q13	Fc fragment of IgE high affinity I	Effecteur de la réponse Th2
IL-4Ra	16p12.1-p12.2	Interleukin 4 receptor alpha chain	Signalisation de l'IL-4 et -13
Groupe III			
CCL5	17q11.2-q12	Chemokine ligand 5 (RANTES)	Chimioattractant pour les monocytes, les cellules T et les éosinophiles
CCL11	17q21.1q21.2	Chemokine ligand 11 (eotaxin-1)	Chimioattractant des éosinophiles
CCL24	7q11.23	Chemokine ligand 11 (eotaxin-2)	Chimioattractant des éosinophiles
ADAM33	20p13	ADAM metalloproteinase domain 33	Interaction cellule-cellule et cellule-tissu
FLG	1q21.3	Filaggrin	Intégrité de la barrière épithéliale
Groupe IV			
ADRB2	5q31-q32	Adrenergic receptor beta 2	Relaxation du muscle lisse
TBXAR2	19p13.3	Tromboxane A2 receptor	Contraction du muscle lisse, inflammation
TNFα	6p21.3	Tumor necrosis factor	Inflammation
TGFβ1	19q13.1	Transforming growth factor, beta 1	Immunorégulation, prolifération cellulaire
LTA	6p21.3	Lymphotoxin alpha	Inflammation

Tableau I: Gènes de susceptibilité associés à l'asthme allergique ou à ses phénotypes dans au moins cinq études d'association indépendantes et basées sur l'approche par gènes candidats. (D'après (Vercelli 2008) et la thèse d'Anne-Gaëlle Besnard, 2010).

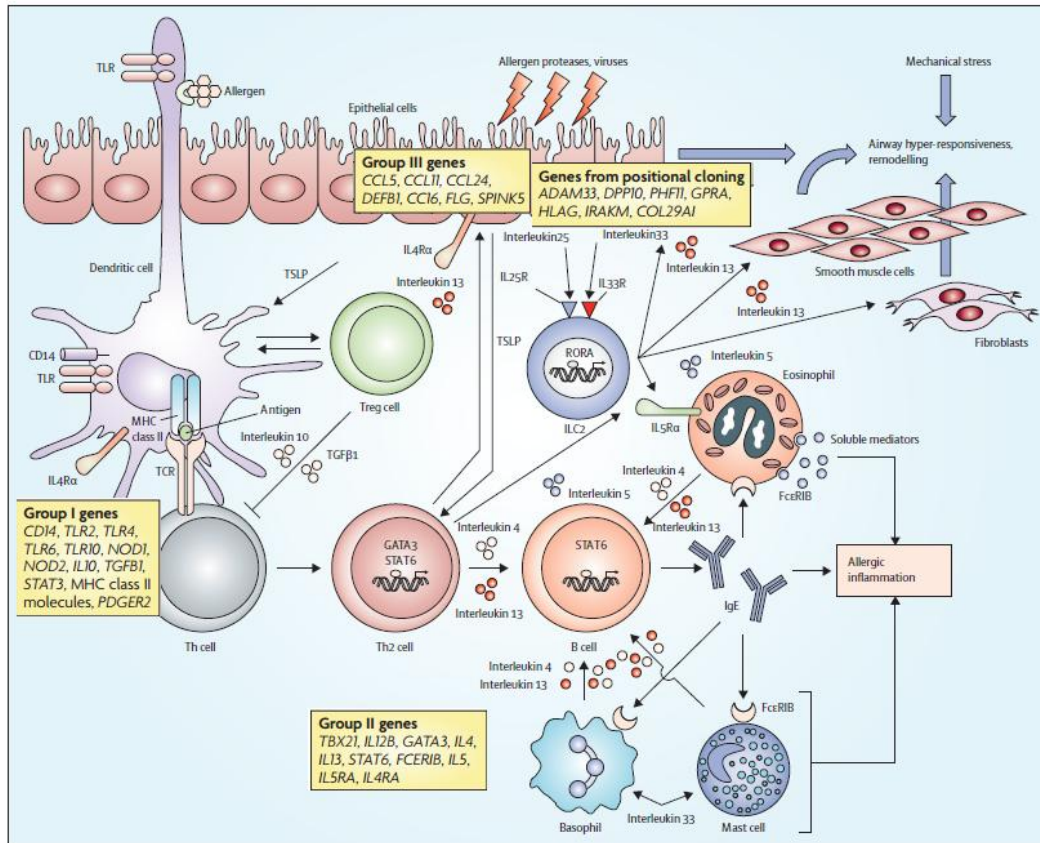


Figure 1: Voies de signalisation majeures impliquées dans l'asthme et gènes de susceptibilité associés à l'asthme. Le groupe I des gènes de susceptibilité à l'asthme codent pour les PRR exprimés entre autre par les cellules dendritiques. Ils codent aussi le CMHII (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II) exprimé par les mêmes cellules et impliqué dans la présentation de l'antigène aux cellules T naïves. Les gènes du groupe II codent pour les cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) produites par les lymphocytes différenciés en Th2. Les gènes du groupe III et les gènes issus du clonage positionnel se situent au niveau des cellules épithéliales puisqu'ils sont associés à leur biologie et à l'immunité mucoale. Les gènes du groupe IV ne figurent pas sur cette représentation mais ils sont associés aux fonctions pulmonaires et au remodelage bronchique (Modifié d'après (Vercelli 2008) et (Martinez and Vercelli 2013))

2.2) L'influence de l'environnement sur l'asthme

Le système immunitaire et le développement pulmonaire commencent au stade embryonnaire. Le comportement maternel a donc une incidence sur leur évolution. Un enfant dont la mère fumait durant sa grossesse sera par exemple prédisposé à développer l'asthme (Torday and Rehan 2013).

Les facteurs environnementaux auxquels l'enfant sera exposé dans ses premières années ainsi que son mode de vie renforceront ses prédispositions à la maladie. En effet, un enfant qui a déjà des difficultés respiratoires dans ses premières années et un système immunitaire fragile aura un risque accru au développement de l'asthme. De plus, il a été montré qu'un enfant en contact avec un environnement fermier et à la fourrure animale présentera moins de risque pour la maladie (Jartti and Gern 2011).

Notre quotidien est rempli de risques en tous genres notamment les allergènes que l'on retrouve à la fois dans notre environnement extérieur mais aussi intérieur. Les

allergènes sont des antigènes susceptibles de déclencher des réponses immunitaires caractérisées par la production d'immunoglobulines de type E (IgE). Dans l'environnement extérieur, le pollen libéré dans l'atmosphère par les plantes et les arbres, déclenche des rhinites allergiques polliniques qui peuvent s'accompagner d'asthme. Il existe également des pneumoallergènes intérieurs comme les phanères d'animaux et plus particulièrement ceux du chat ainsi que certaines moisissures. Le tabagisme passif ou la fumée de cheminée constituent également des facteurs pouvant induire l'asthme tout comme les acariens de la poussière domestique. Certains allergènes responsables d'asthme sont contenus dans les aliments comme par exemple l'ovalbumine du blanc d'œuf, les sulfites présents dans le vin et dans certains médicaments ou encore la farine de blé. D'autres allergènes sont à l'origine de l'asthme professionnel comme les isocyanates contenus dans les teintures et peintures. L'environnement immédiat a donc une place prépondérante dans le développement de l'asthme.

2.3) Les facteurs aggravant l'asthme

L'action combinée de certains facteurs environnementaux et d'allergènes accroît l'asthme allergique. C'est le cas de la pollution urbaine qui aggrave la toxicité des pollens en fragilisant la surface des grains et en permettant la sortie des protéines allergisantes. De plus, la pollution atmosphérique à l'ozone, les hydrocarbures des gaz d'échappement et les particules de diesel agissent directement sur la muqueuse bronchique et peuvent entraîner une inflammation des voies respiratoires, occasionnant des difficultés respiratoires supplémentaires aux patients asthmatiques.

Chez le jeune enfant, le tabagisme passif occasionné par des parents fumeurs augmente également le risque de développer un asthme (Kobayashi, Bossley et al. 2014).

L'asthme présente aussi des particularités selon le sexe du patient. En effet, des différences s'observent dès le plus jeune âge : la fréquence de l'asthme chez les jeunes garçons est de 9,6% contre 7,4% chez les filles selon le site internet « Réseau asthme ». Cependant, cette disparité s'équilibre à la puberté et s'inverse chez l'adulte. En effet, pendant le cycle menstruel d'une femme, les variations hormonales joueraient un rôle puisqu'il a été montré que plus d'un tiers des femmes présentent une aggravation de leur asthme lors de ces périodes. Pendant la grossesse, il y a un tiers des femmes qui présentent une amélioration de leur asthme, un autre tiers présentent une exacerbation de la maladie tandis que le dernier tiers reste stable (Murphy, Gibson et al. 2005). De plus, pendant une période de grand bouleversement hormonal comme la ménopause, le risque de majoration de l'asthme est doublé en cas de traitement hormonal (Zemp, Schikowski et al. 2012).

III) PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME ALLERGIQUE

L'asthme est une maladie inflammatoire qui se développe en plusieurs étapes.

- Lors de la première étape, l'allergène entre en contact avec les cellules épithéliales. La réponse allergique est initiée sous la dépendance des cellules dendritiques.
- Vient ensuite l'étape effectrice où la réponse inflammatoire est provoquée par la libération de médiateurs chimiques par les cellules inflammatoires.
- Enfin, l'étape de remodelage bronchique est amorcée au cours de laquelle les bronches subissent des altérations en partie irréversibles.

3.1) La phase d'immunisation

Le développement clinique de la sensibilisation à un allergène dépend de plusieurs facteurs (Galli, Tsai et al. 2008):

- Le génotype de l'hôte
- Le type d'allergène
- La concentration d'allergène dans l'environnement
- Le temps d'exposition aux agents qui déclenchent le processus de sensibilisation tels que les ligands de TLR c'est-à-dire les endotoxines, la chitine, plusieurs organismes et des polluants de l'environnement
- Le type de contact du système immunitaire avec l'allergène
- La sous-population de cellules dendritiques qui participe à la réponse immunitaire
- Les facteurs génétiques et environnementaux qui influencent l'épithélium (sa perméabilité aux allergènes peut favoriser le développement de la réponse des cellules Th2)

Les cellules épithéliales représentent la première ligne de défense aux allergènes inhalés. Ces cellules expriment des récepteurs TLR et d'autres récepteurs de reconnaissance (PRR) (Lambrecht and Hammad 2013).

En plus de l'épithélium et de la muqueuse pulmonaire, se trouve une population de cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène (Allergen-presenting cells, APCs). Il s'agit des cellules dendritiques (DCs). L'allergène pénètre dans les poumons en franchissant la barrière épithéliale soit en créant un dommage à la surface des cellules épithéliales soit par reconnaissance via les cellules dendritiques (Holgate 2012).

Ces cellules forment alors un réseau très dense capable de prendre en charge l'allergène et de le dégrader en peptides. Elles vont ensuite migrer vers les ganglions

lymphatiques drainants et présenter ces peptides aux récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T naïfs (T cell receptor, TCR) via le CMH de classe I ou II (**Figure 2**).

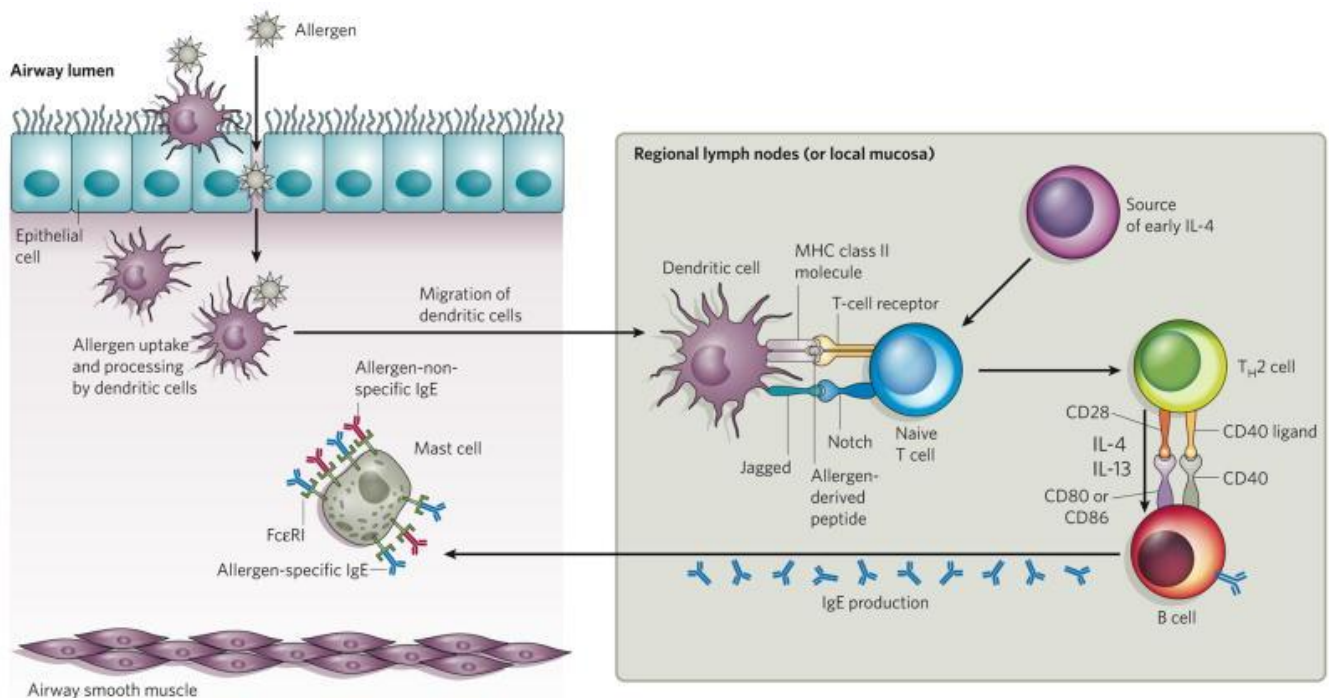


Figure 2 : Sensibilisation des voies respiratoires par un allergène. L'allergène franchit la barrière des cellules épithéliales et est reconnu par les récepteurs exprimés par les cellules dendritiques. Ces cellules dégradent l'allergène en peptides et migrent vers les ganglions lymphatiques où elles présentent les peptides aux cellules T naïves. Cette reconnaissance s'effectue via le CMH de classe II exprimé par les DC et le TCR exprimé par les lymphocytes T naïfs. Par cette reconnaissance, les cellules T se différencient en Th2 produisant des cytokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-13) qui activent les lymphocytes B. Ces lymphocytes produisent des immunoglobulines E qui vont migrer vers la source de l'inflammation où ils vont se fixer sur les récepteurs FcεRI exprimés par les mastocytes. Ceci déclenchera la dégranulation des mastocytes et la libération des médiateurs de l'inflammation induisant la réponse inflammatoire (Galli, Tsai et al. 2008).

En présence de signaux inflammatoires tels que l'exposition à de faibles quantités de produits d'origines bactériennes ou lors d'infection pulmonaire virale, cette présentation aura pour conséquence la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T auxiliaires 2 (Th2 ou T helper 2) (**Figure 3**).

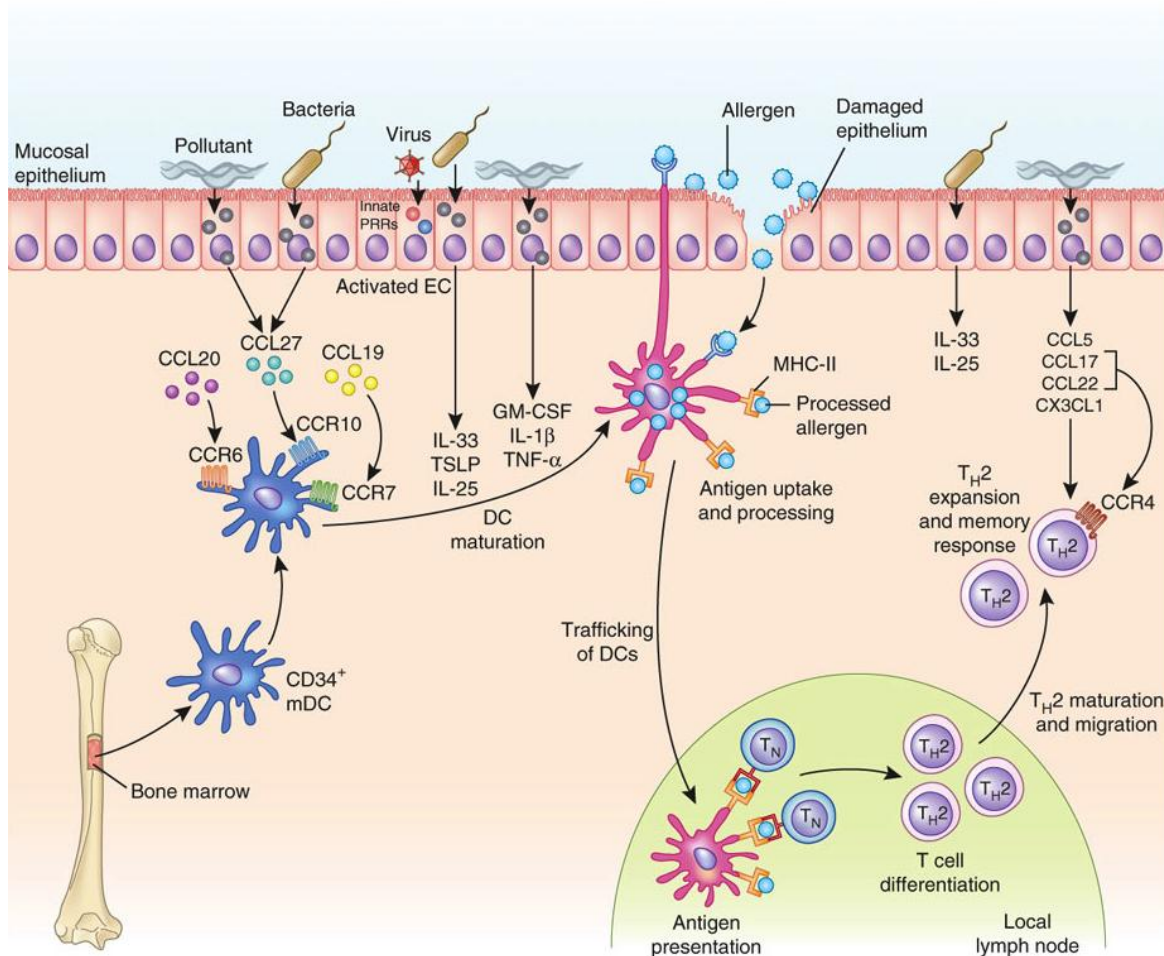


Figure 3: Première sensibilisation des voies respiratoires et induction de la réponse asthmatique allergique. Le processus est le même que celui décrit dans la figure 2 auquel s'ajoute d'autres stimuli comme des produits d'origines bactériennes ou virales (Holgate 2012).

Après maturation et expansion clonale, une partie de ces lymphocytes Th2 se retrouve en circulation tandis que les autres s'accumulent dans les ganglions lymphatiques et la rate, constituant ainsi un stock de cellules T mémoires. Lors d'un nouveau contact avec l'allergène, ces cellules pourront produire rapidement et en grande quantité des cytokines pro-inflammatoires caractéristiques d'une réponse allergique : l'interleukine-4 (IL-4) et l'IL-13 impliquées dans la production d'Immunoglobuline E (IgE) par les lymphocytes B.

D'autre part, les cellules épithéliales produisent des cytokines telles que l'IL-33, l'IL-25 et TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) en réponse aux signaux inflammatoires (bactéries, virus, pathogènes reconnus par les TLR exprimés à la surface des cellules épithéliales). Ces cytokines sont à l'origine du maintien de l'homéostasie des muqueuses. L'exposition des cellules dendritiques à TSLP et à l'IL-33 entraîne le développement d'un phénotype qui permet la différenciation des cellules T en cellules Th2 dans les ganglions lymphatiques drainants. De plus, l'IL-33, le TSLP et l'IL-25 sont impliquées dans le recrutement d'un type cellulaire de l'immunité innée récemment découvert, les ILC2 (innate lymphoid cell 2)

participant à la réponse allergique via la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 (Williams, Rahman et al. 2012; Chaput, Sander et al. 2013) (Figure 5).

En revanche, en absence de signaux pro-inflammatoires, le système immunitaire tolère l'inhalation de ces allergènes inoffensifs. Les cellules dendritiques sécrètent alors de l'IL-10 provoquant ainsi l'induction des lymphocytes T régulateurs qui participent à la tolérance immunitaire et inhibent les réponses des lymphocytes T effecteurs (Holgate 2012) (Figure 4)

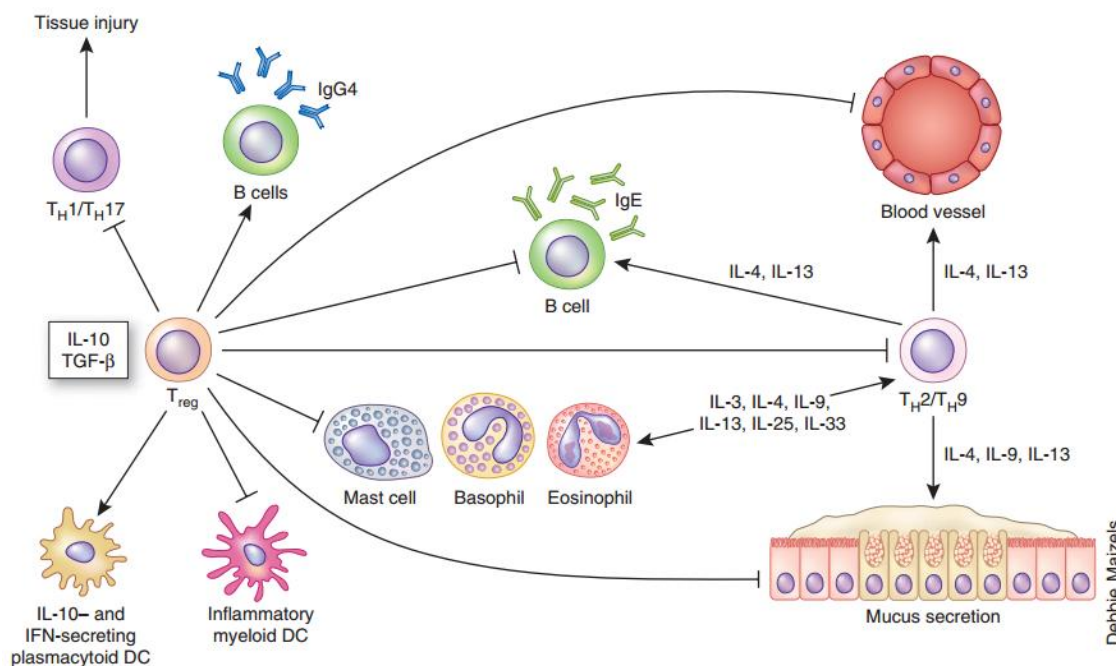


Figure 4 : Effet des lymphocytes Treg dans la suppression des voies de signalisation pro-inflammatoires dans la réponse à l'allergène. Les lymphocytes T régulateurs sont stimulés par l'IL-10 et le TGF-β. Ces cellules inhibent la réponse d'autres types cellulaires (lymphocytes Th1/Th17, lymphocytes B, mastocytes, basophiles, éosinophiles, plusieurs types de cellules dendritiques) (Holgate 2012).

3.2) La phase effectrice

3.2.1) La réaction d'asthme immédiate ou précoce

Certains symptômes de l'asthme apparaissent dès la première heure après l'exposition à l'allergène comme des dyspnées et des difficultés respiratoires, la toux et la sensation d'oppression thoracique. L'apparition de ces symptômes s'explique par la production de médiateurs chimiques provenant de la dégranulation des mastocytes, basophiles ou éosinophiles, ayant pour conséquence majeure la contraction des muscles lisses bronchiques et la formation d'œdèmes.

La production des cytokines pro-inflammatoires IL-4 et IL-13 par les cellules Th2 et les ILC2 permet la libération par les lymphocytes B d'immunoglobuline E dans la circulation. Ces IgE ont la capacité de se lier aux récepteurs FcεRI à la surface des mastocytes et des basophiles (Figure 2).

De plus, la production d'IL-5 par les cellules Th2 et les ILC2 permet le recrutement de cellules spécifiques de l'inflammation : les éosinophiles. La présence de l'allergène entraîne la dégranulation des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles libérant des médiateurs pré-formés tels que l'histamine, des peroxydases, des facteurs chimiotactiques et des protéases neutres, ou de médiateurs néo-formés tels que les superoxydes, des cytokines, des facteurs d'activation plaquettaires, des leucotriènes et des prostaglandines (Holgate 2008) (Figure 5)

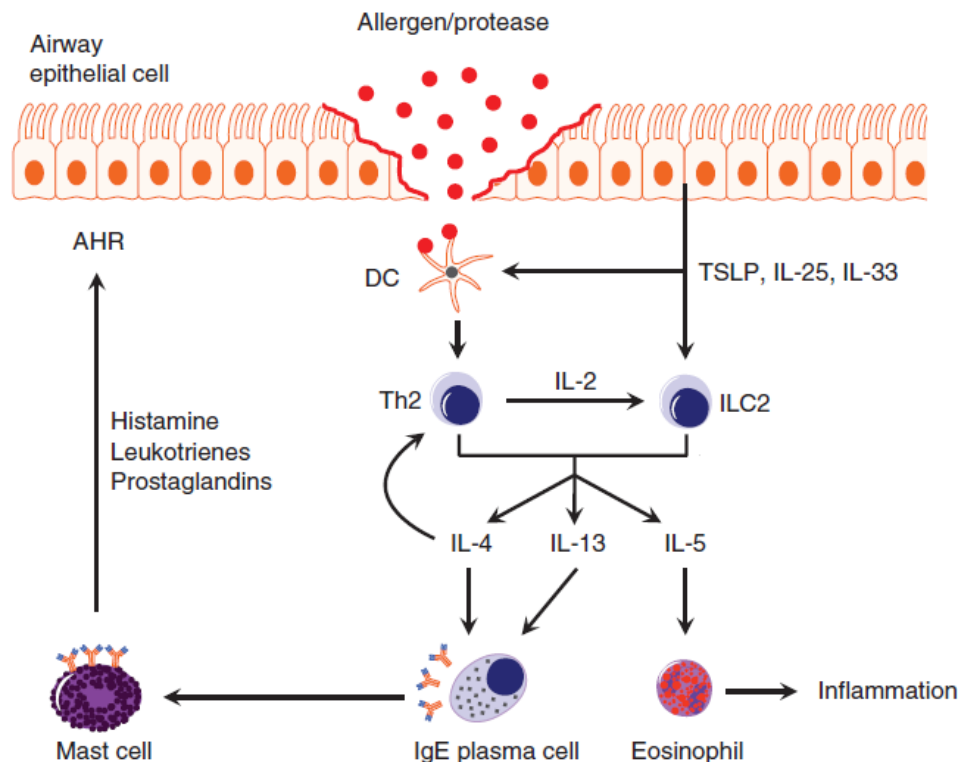


Figure 5: Représentation schématique de la cascade inflammatoire dans l'asthme allergique. L'allergène ou les protéases qu'il contient rompt les jonctions serrées des cellules épithéliales et franchit la barrière de ces dernières. Elles produisent l'IL-25, l'IL-33 et le TSLP qui stimulent à la fois les cellules dendritiques et les ILC2 (Innate Lymphoïdes Cell 2). Les cellules Th2 activées et les ILC2 produisent à leur tour de l'IL-5 stimulant les éosinophiles et l'inflammation. L'IL-4 et l'IL-13 produites par les cellules Th2 et les ILC2 induisent la production d'IgE qui se fixe sur les récepteurs FcεRI des mastocytes entraînant leur dégranulation. Ces granules sont notamment constitués d'histamine, de leucotriènes et de prostaglandines qui stimulent l'hyperréactivité bronchique (Modifié d'après (Chaput, Sander et al. 2013)).

Les médiateurs pré-formés sont responsables de la vasodilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui induisent des œdèmes et des changements fonctionnels importants pour les organes touchés tels que la bronchoconstriction, la sécrétion de mucus dans les voies respiratoires, des crises urticaires, des vomissements et des diarrhées. En revanche, les médiateurs néo-formés sont eux responsables du recrutement et de l'activation locale des leucocytes, contribuant au développement de la réaction d'asthme tardive (Galli, Tsai et al. 2008).

3.2.2) La réaction d'asthme tardive

La réaction d'asthme tardive se développe typiquement 2 à 6 heures après l'inhalation de l'allergène avec un pic plus élevé de 6 à 8 heures (Galli, Tsai et al. 2008). Elle est souvent plus sévère que la phase précoce et est caractérisée par l'accumulation de cellules mononuclées (monocytes et lymphocytes) et d'éosinophiles. L'accumulation de ces populations cellulaires ou l'exposition répétée à des allergènes spécifiques, à l'origine de l'inflammation chronique, sont associées aux dysfonctionnements prolongés des voies respiratoires ainsi qu'aux dommages structuraux des voies aériennes. (Lukacs 2001) (Figure 6)

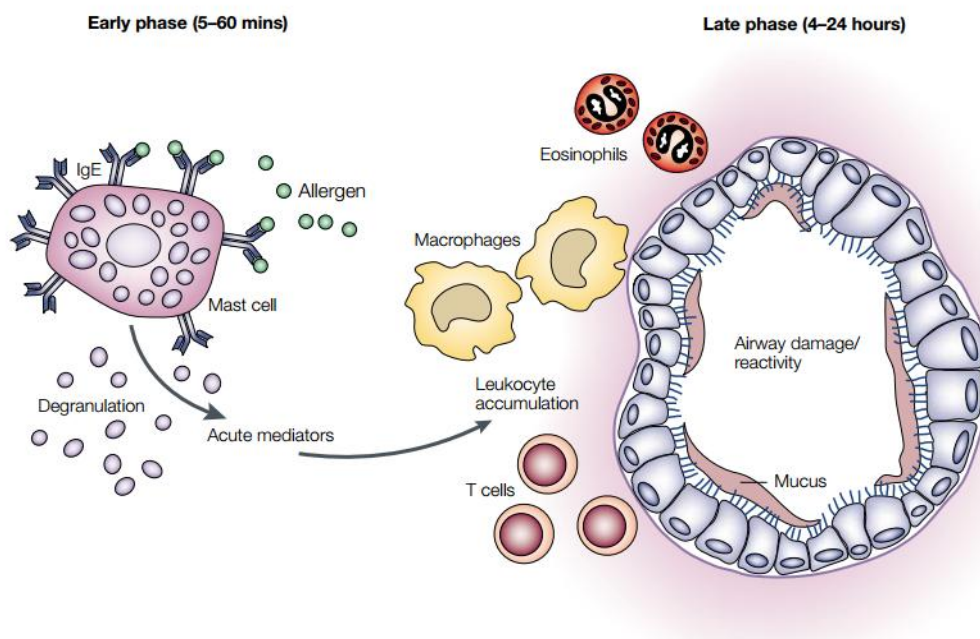


Figure 6: Représentation schématique des deux principales phases effectrices de l'asthme allergique : la phase précoce et la phase tardive. Lors de la phase précoce (entre 5 et 60 min après l'exposition à l'allergène), la conséquence principale est la libération des médiateurs de l'inflammation par les mastocytes. Lors de la phase tardive (entre 4 et 24h après l'exposition à l'allergène), ces médiateurs agissent et entraînent l'accumulation des leucocytes, d'éosinophiles, de cellules T et de macrophages en grande quantité. Ceci à pour conséquence la production de cytokines par ces cellules qui engendre des changements structuraux des voies aériennes ainsi qu'une production de mucus (Lukacs 2001).

3.3) La phase de remodelage bronchique

L'inflammation persistante induite par une exposition prolongée ou répétitive à un allergène spécifique a pour conséquence la modification structurale des voies aériennes. Ces changements interviennent au niveau de la matrice extracellulaire à cause de l'altération du nombre, du phénotype ou de la fonction des cellules impliquées dans la structure des tissus affectés. D'un point de vue histopathologique, le remodelage bronchique se caractérise par un épaississement des parois bronchiques, incluant l'épithélium, la lamina reticularis, les sous-muqueuses et les muscles lisses. Certains TLR sont exprimés de manière intracellulaire à l'intérieur du réticulum endoplasmique, dans des endosomes, des vésicules ou des lysosomes. Les virus peuvent fusionner avec la membrane plasmique et se retrouver dans les endosomes où ils sont reconnus uniquement par les TLR endosomaux (Blasius and Beutler 2010), créant une bronchoconstriction. L'hyperplasie des cellules en gobelet aussi appelées cellules caliciformes à pour conséquence une hypersécrétion de mucus. En effet, ces cellules sécrètent des glycoprotéines, les mucines (MUC), composant principal du mucus. Chez l'homme, il en existe 13 dont la plus connue est MUC5AC qui est exprimée dans les voies respiratoires des sujets sains et est surproduite chez les sujets asthmatiques. L'hypertrophie des cellules glandulaires est donc associée à une hypersécrétion de mucus et une desquamation de l'épithélium (Shifren 2012) (Figure 7).

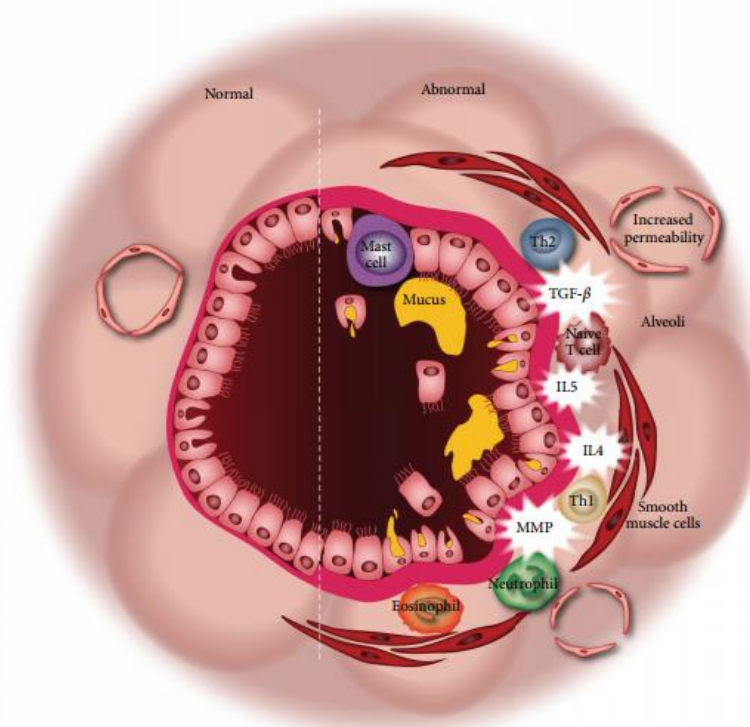


Figure 7: Représentation schématique d'une bronche normale (à gauche) et d'une bronche ayant subi un remodelage (à droite). Lors du remodelage bronchique, la paroi bronchique s'épaissit tout comme les cellules caliciformes qui produisent alors du mucus, caractéristique de

l'asthme. Des cytokines pro-inflammatoires sont produites en abondance (IL-4, IL-5, TGF- β), des cellules sont recrutées sur le site d'inflammation (éosinophiles, neutrophiles, cellules Th2) et l'expression des métalloprotéinases (TIMP) est augmentée (Shifren 2012)

Parmi les changements structurels, il est également noté une augmentation des dépôts de protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et le collagène de type I, III et V sur les myofibroblastes (Galli, Tsai et al. 2008). Cette augmentation est due à un déséquilibre de l'expression des métalloprotéinases qui dégradent ces protéines et de leurs inhibiteurs endogènes (les TIMP). Ceci conduit à une accumulation de fibroblastes et de myofibroblastes activés, créant ainsi une fibrose et une inflammation chronique.

D'un point de vue immunologique, on note une augmentation du recrutement des éosinophiles et des neutrophiles ainsi qu'une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-5 entre autres).

IV) LES PRR, SENSEURS DE L'IMMUNITE INNEE

Certaines cellules comme les cellules épithéliales et les cellules présentatrices d'antigène (CPA) sont équipées de récepteurs. L'induction d'une réponse innée repose sur la reconnaissance de motifs moléculaires par ces récepteurs connus sous le nom de « senseurs » de l'immunité innée ou PRR. Ils détectent rapidement les motifs moléculaires particuliers associés aux pathogènes (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) que l'on trouve dans les micro-organismes ou les motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (DAMPs, damage-associated molecular patterns) libérés aussi lors d'une mort ou d'un stress cellulaire. L'activation des PRR conduit à la libération de cytokines, de chimiokines et de peptides antimicrobiens qui attirent et activent les cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (Lambrecht and Hammad 2012). Parmi les PRR exprimés par l'épithélium pulmonaire et les CPA, se trouvent les TLR (toll-like receptors), les NLR (NOD-like receptors), les CLR (C-type lectin receptors) et les PAR (proteases-activated receptors). Tous ces récepteurs sont des senseurs de l'immunité innée, conservés au cours de l'évolution, qui ont pour rôle la détection de signaux de danger.

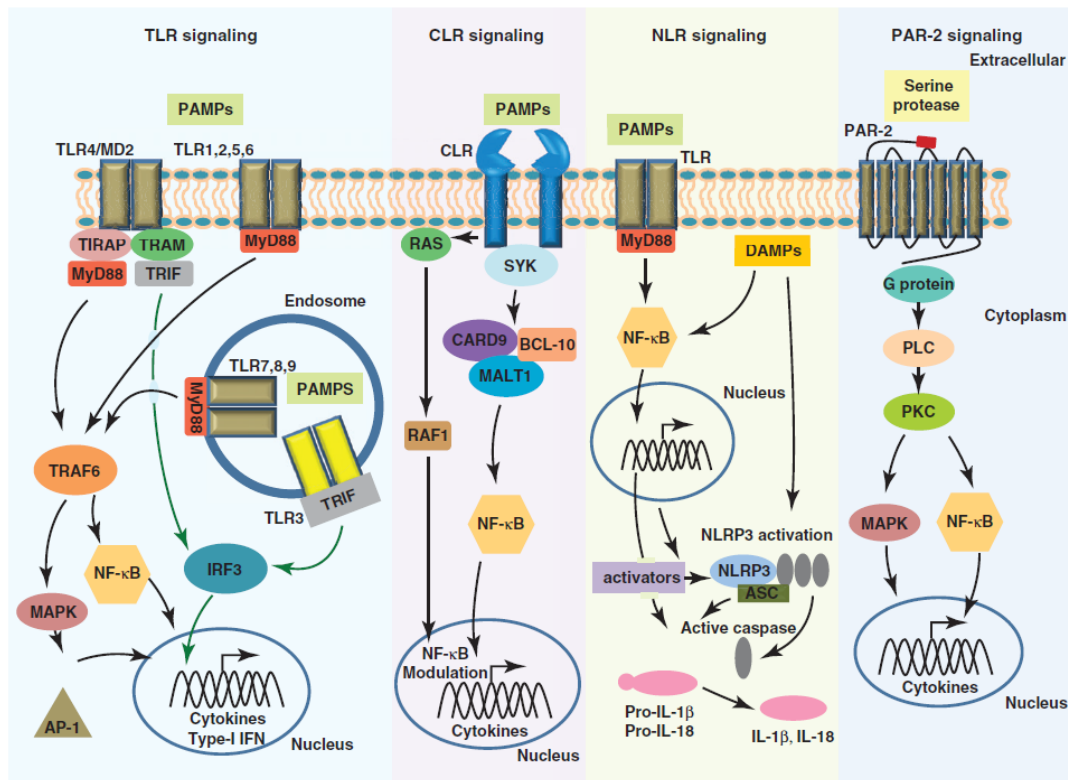
4.1) Les TLR (Toll-Like Receptors)

Le groupe le plus important des récepteurs de l'immunité est le groupe des récepteurs « Toll-like » ou TLR découvert en 1980 pour leur rôle dans le développement de la drosophile. En 1996, Jules Hoffman et Bruno Lemaitre découvrent que des mutations dans Toll rendaient les mouches sensibles à des infections létales par le champignon

Aspergillus fumigatus. C'est en 1997 que Ruslan Medzhitov et Charles Janeway montrent l'existence de récepteurs similaires chez l'homme. Cette protéine humaine est nommée TLR4.

Les études menées sur les TLR montrent que ces récepteurs sont des protéines possédant une région extracellulaire qui contient des motifs structuraux appelés LRR (leucine-rich repeats), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire TIR (Toll/IL-1 receptor) recruté lorsque les TLR se lient à leur ligands. Les LRR détectent les produits microbiens et reconnaissent différents ligands intracellulaires (ARN simple brin ou double brin viral, ADN bactérien) ou extracellulaires (le lipopolysaccharide des bactéries (LPS), les parasites, les champignons).

Ainsi, 13 récepteurs TLR ont été découverts chez la souris et 10 chez l'homme. La reconnaissance TLR/ligand active diverses voies de signalisation via une série de protéines adaptatrices (TIRAP, MyD88, TRAM, TRIF) ainsi que l'activation de NF- κ B ou des facteurs IRF3 et IRF7 (interferon regulatory factor). Cette cascade induit la production de cytokines pro-inflammatoires, IL-1, IL-6, IL-8 et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), des interférons, de chimiokines (comme le MIP- α (Macrophage Inflammatory Protein 1 α), ou le CCL3 (CC Chemokine Ligand 3) et l'éotaxine), de prostaglandines et de défensines (Akira, Yamamoto et al. 2003) (Figure 8).



TRENDS in Molecular Medicine

Figure 8 : Schéma simplifié des voies de signalisation des PRR : Toll-like receptors (TLR), C-type like receptors (CLR), NOD-like receptor (NLR) et proteases-activated receptors (PAR-2) (Jacquet 2011).

Le TLR4 exprimé à la surface des cellules épithéliales reconnaît les allergènes et joue un rôle notamment dans l'asthme allergique induit par l'allergène d'acarien HDM (house dust mite) (Hammad, Chieppa et al. 2009). En effet, un des ligands du TLR4 est le lipopolysaccharide (LPS) retrouvé sur la paroi ou à la surface des bactéries Gram négatives. Du LPS est aussi retrouvé dans des allergènes inhalés comme le pollen, les extraits d'acariens et les squames d'animaux (Lloyd 2009). Afin de déterminer l'implication du TLR4 dans la mise en place de l'asthme allergique induit par HDM, Hammad et al, ont travaillé sur des souris sauvages et des souris déficientes pour le TLR4 qu'ils ont irradiées pour pouvoir ensuite reconstituer le compartiment hématopoïétique en injectant de la moelle osseuse de souris sauvages ou TLR4^{-/-}. A partir de ces souris chimériques, ils ont pu montrer que le récepteur TLR4 exprimé sur les cellules épithéliales pulmonaires est indispensable pour l'activation des cellules dendritiques dans les poumons et donc pour l'initiation de la réponse Th2 à HDM (Hammad, Chieppa et al. 2009). La reconnaissance de l'allergène d'acarien HDM par le TLR4 a pour conséquence la production de cytokines telles que GM-CSF, TSLP, IL-25 et IL-33 dans les poumons ainsi qu'une éosinophilie, une hyperréactivité bronchique, une production d'IgE et un remodelage bronchique (Lloyd 2009) (Figure 9).

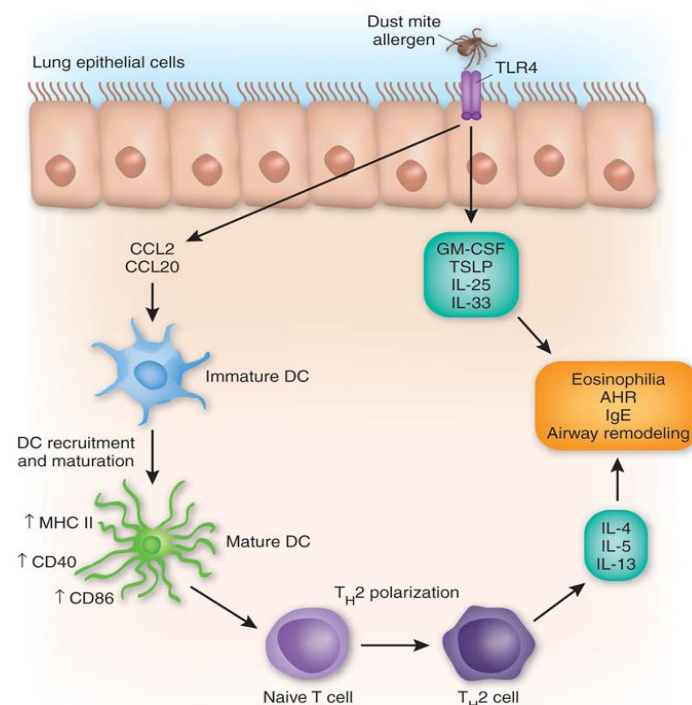


Figure 9 : Mécanisme d'activation de la réponse immunitaire dans le cadre de l'asthme allergique induit par l'allergène d'acarien HDM (house dust mite) reconnu par le récepteur TLR4 (Toll-Like Receptor-4) à la surface des cellules épithéliales. Ceci a pour conséquence la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires qui activent des cellules dendritiques. Ces cellules sont impliquées dans la polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2 et donc indirectement dans le recrutement des éosinophiles, la production d'IgE, l'hyperréactivité et le remodelage bronchique (Lloyd 2009).

Plus récemment, il a été montré qu'en plus du TLR4, le TLR2 serait aussi requis pour l'induction de la réponse allergique induit par HDM (Liu, Drocourt et al. 2013). En effet, l'extrait d'acarien HDM contiendrait du LPS, un agoniste du TLR4, et du β -glucane, un agoniste du TLR2. De plus, la co-stimulation du TLR2 et du TLR4 par HDM pourrait contribuer à la modulation de la production de la cytokine IL-12p40 impliquée dans la régulation de l'hyperréactivité bronchique dans les cas d'expositions prolongées aux allergènes (Onari, Yokoyama et al. 2009; Liu, Drocourt et al. 2013).

Ainsi, TLR pourraient constituer des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de l'asthme allergique.

4.2) Les NLR (NOD-Like Receptors)

La famille des récepteurs NLR «Nucleotide-binding and oligomerization domain (Nod-like receptors) » comprend au total 22 membres chez l'homme et bien plus chez la souris. Il s'agit d'un groupe de récepteurs très conservés au cours de l'évolution démontrant ainsi leur rôle primordial et vital dans la défense de l'hôte contre les pathogènes (Zhong, Kinio et al. 2013).

Tout comme les TLR, les NLR possèdent en C-terminal un domaine riche en leucine (LRR) permettant la reconnaissance de ligands. Ils possèdent également un domaine central de liaison aux nucléotides et d'oligomérisation des protéines portant différents noms : NACHT, NOD ou NBD (Nucleotide-binding domain) et un domaine effecteur variable en N-terminal nécessaire à la transduction du signal. Ce dernier est composé d'un domaine PYD (Pyrin Domain), CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) ou BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat) (Walsh, Muruve et al. 2014) (Figure 10).

Ainsi, il existe des sous-familles de NLR : NLRA, NLRB, NLRC et les NLRP selon la nature du domaine N-terminal. Lorsque les différents domaines sont assemblés, ils peuvent former un complexe multiprotéique : l'inflammasome (NLRC, NLRP ou NAIP) découvert pour la première fois en 2002 par Jürg Tschopp et ses collègues (Martinon, Burns et al. 2002). Mais il existe des NLR non-inflammasome : les NOD (Zhong, Kinio et al. 2013).

Après activation et oligomérisation, les inflammasomes NLRP recrutent une protéine adaptatrice appelé ASC (apoptosis-associated speck-like protein) contenant un domaine CARD et un domaine PYD. Cette protéine agit comme un adaptateur entre le domaine PYD des protéines NLRP et le domaine CARD de la procaspase-1. La caspase-1 (ou ICE pour Interleukin-1 beta Converting Enzyme) est une protéase impliquée dans l'inflammation et l'apoptose (Martinon, Mayor et al. 2009). Celle-ci doit être activée par clivage par certains inflammasomes pour remplir ses fonctions. Cependant, ceci n'est pas applicable à tous les

inflammasomes. En effet, il en existe qui sont ASC-indépendants comme NLRC4 par exemple (**Figure 10**) (Jacquet 2011).

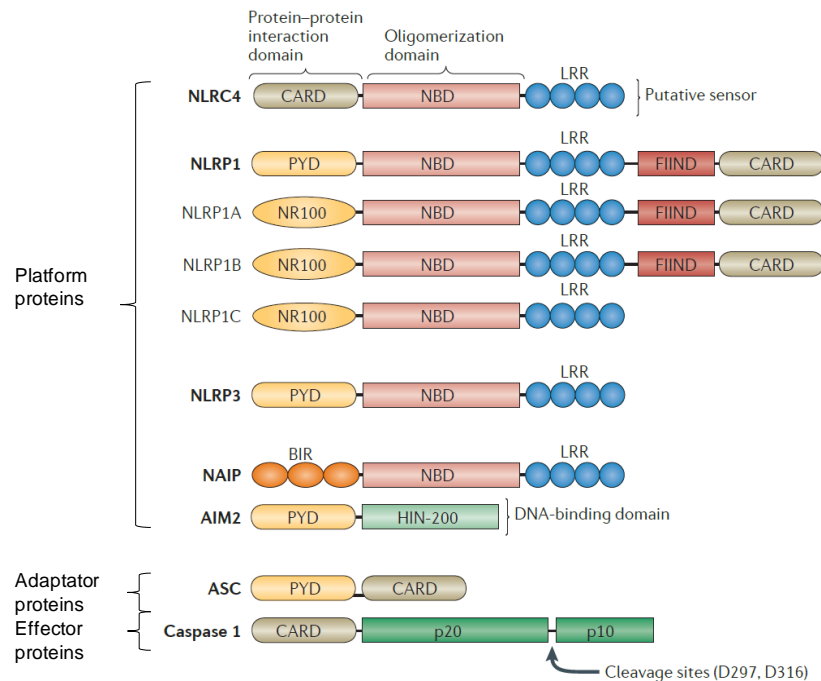


Figure 10: Organisation structurale des inflammasomes. Les inflammasomes sont des plateformes multiprotéiques cytoplasmiques composées de récepteur NLR, d'une protéine adaptatrice ASC et d'une protéine effectrice de la famille des caspases. Chaque interaction se fait via des domaines homologues (Modifié d'après (Walsh, Muruve et al. 2014)).

Contrairement aux TLR, ces récepteurs sont localisés dans le cytosol et sont donc intracellulaires. De plus, les fonctions des NLR ne se limitent pas seulement à l'immunité puisqu'ils jouent également un rôle dans la reproduction et le développement embryonnaire.

4.3) Les CLR (C-type lectin Receptors)

Les CLR (C-type Lectin Receptors) constituent une large famille de récepteurs qui se lient aux carbohydrates de manière calcium-dépendante. L'activité lectine de ces récepteurs est régie par les domaines conservés CRD (carbohydrate-recognition domains).

Le seul PRR dont le rôle est clairement défini dans l'activation des cellules de l'immunité innée induite par HDM est le CLR Dectin-2. En effet, les β -glucanes contenus dans l'extrait d'acarien HDM se lient au récepteur Dectin-2 (Jacquet 2011). Dans les poumons de souris naïves, le récepteur myéloïde Dectin-2 est exprimé par les cellules CD68⁺ CD11^{low} qui seraient des macrophages alvéolaires (Clarke, Davis et al. 2014). Dans l'asthme allergique induit par HDM, Dectin-2 dirige la génération des cellules Th2 et Th17 par la libération de cysteinyl leucotriène et de cytokines pro-inflammatoires par les cellules dendritiques (Parsons, Li et al. 2014). De plus, Dectin-2 joue un rôle critique dans le

développement de l'éosinophilie et de la neutrophilie induites par l'exposition à HDM (Jacquet 2011).

La signalisation des CLR conduit à l'activation de la protéine Syk (Spleen tyrosine kinase) qui active à son tour un complexe protéique composé de CARD9, BCL-10 et MALT-1 (caspase recruitment domain family, member 9 ; B cell lymphoma 10 ; mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1) qui active NF- κ B et qui module ensuite la transcription de cytokine pro-inflammatoire. De plus, de façon Syk-indépendante, l'activation des CLR conduit à la phosphorylation de la protéine RAF-1 par la protéine RAS. L'activation de RAF-1 module l'induction de NF- κ B par les TLR pour augmenter la transcription de cytokine (**Figure 8**) (Jacquet 2011). Ainsi par ces voies de signalisation, les CLR participent à l'induction de la réponse allergique en reconnaissant des allergènes tels que HDM.

4.4) Les PAR (proteinase-activated Receptors)

Les récepteurs PAR (proteinase-activated receptors) ne sont pas considérés comme d'authentiques PRR. Ils contribuent à la défense de l'immunité innée et jouent également un rôle de surveillance en détectant les protéases extracellulaires microbiennes.

Ils sont activés par clivage protéolytique de leur extrémité N-terminale par des sérines protéases. PAR-2 peut être activé par la cystéine protéase Der p 1 (*Dermatophagoides pteronyssinus* 1) contenue dans l'extrait d'acarien HDM, induisant la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules épithéliales pulmonaires, une polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2 et un remodelage bronchique (**Figure 11**) (Jacquet 2011).

PAR-2 est un récepteur couplé aux protéines G (GPCR). Lorsqu'il est activé par les sérines protéases, il induit une cascade de signalisation incluant l'activation de la phospholipase C (PLC) via un mécanisme Ca^{2+} dépendant, la protéine kinase C (PKC), la voie des MAP kinase ainsi que l'activation de NF- κ B, participant ainsi à l'induction de la réponse asthmatique allergique (**Figure 8**) (Jacquet 2011)

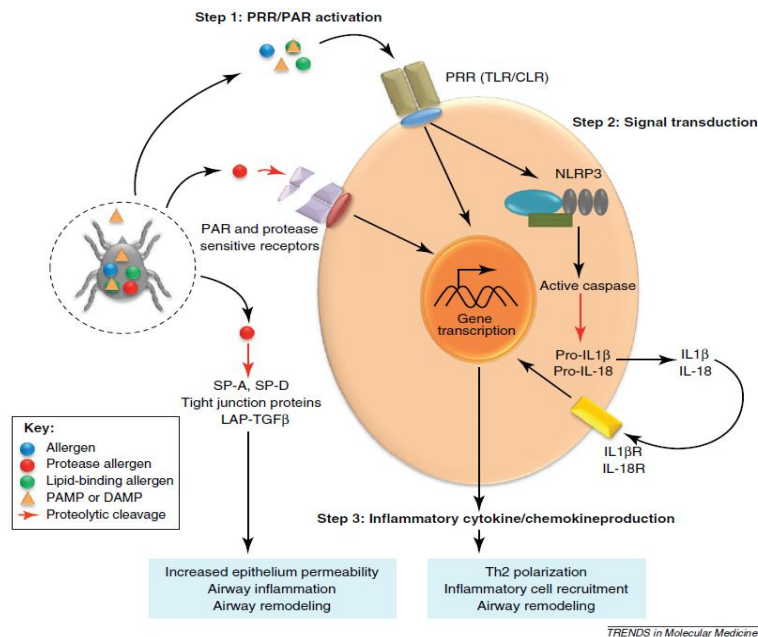


Figure 11: Activation des cellules de l'immunité innée par l'allergène HDM. HDM est reconnu par des PRR tels que les TLR ou les CLR exprimés par plusieurs types cellulaires différents. Ceci entraîne une transduction de signal qui permet l'activation de l'inflammasome NLRP3 et l'activation de la caspase-1 qui permet la maturation des proformes de l'IL-1 β et de l'IL-18 en leurs formes matures. Les protéases contenues dans HDM sont reconnues par les récepteurs PAR ou bien agissent directement sur les jonctions serrées des cellules épithéliales pour les dégrader (Jacquet 2011).

V) LES MEDiateurs CELLULAIRES DE L'ASTHME ALLERGIQUE

Une réponse immunitaire fait intervenir un certain nombre de cellules possédant chacune des caractéristiques et des fonctions bien précises. Les cellules épithéliales, à la frontière entre l'environnement extérieur et intérieur de l'organisme, constituent la première barrière de défense. Viennent ensuite les cellules dendritiques capables de détecter et de dégrader les pathogènes. Les macrophages déploient un grand nombre de défenses contre ces derniers comme la phagocytose. Les lymphocytes contrôlent les attributs immunologiques de spécificité, de diversité, de mémoire et de reconnaissance du soi et du non soi. Les NKT sont des sentinelles qui éliminent les cellules anormales tout en respectant les cellules saines. Les éosinophiles, libèrent des médiateurs en cas d'attaque par les allergènes et les cellules lymphoïdes innées, petite population mais non des moindres, sont les nouvelles cellules récemment découvertes.

5.1) Les cellules épithéliales

Le poumon humain est la plus large surface exposée en continu avec le monde extérieur. Il présente une surface de 100 m² en contact avec environ 10.000 litre d'air inhalé

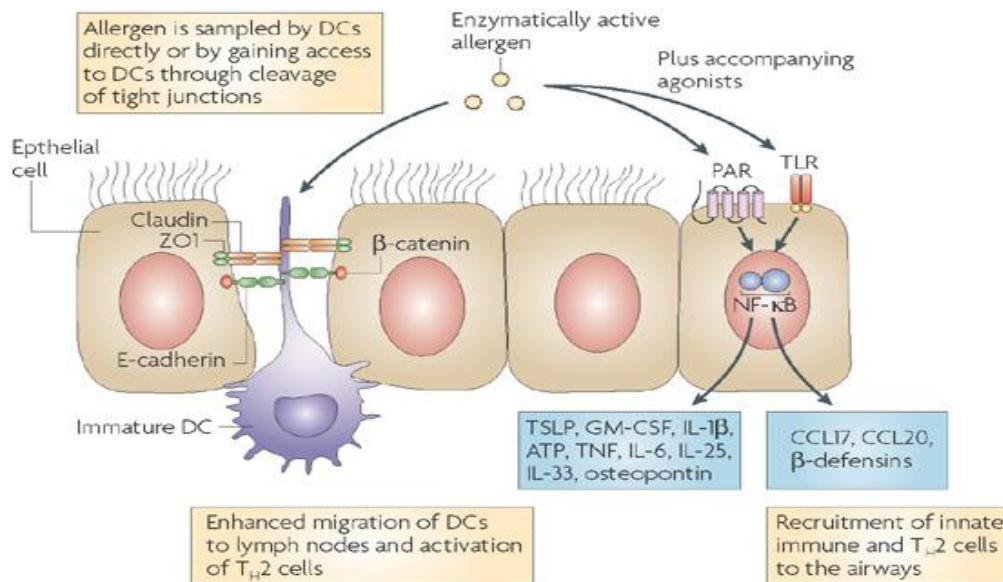
chaque jour, contenant de nombreux agents physiques, chimiques et biologiques potentiellement nocifs. (Holgate 2007). Les cellules épithéliales constituent la première ligne de défense entre l'environnement extérieur (microorganismes, gaz, allergènes) et l'organisme. Elles sont connues pour jouer un rôle fondamental dans la pathogenèse de l'asthme et les réponses inflammatoires. Des dommages tissulaires et des réparations aberrantes sont les causes des interactions de l'épithélium pulmonaire avec les facteurs environnementaux. La rupture des jonctions serrées des cellules épithéliales permet aux substances inhalées de passer plus facilement à travers le mur des voies respiratoires pour interagir avec les cellules immunitaires et inflammatoires (Holgate 2007).

De récentes études ont démontré que l'activation des cellules épithéliales par les PRR qu'elles expriment était un événement clé dans la reconnaissance des allergènes inhalés qui activent le réseau local d'un autre type cellulaire tout aussi important, les cellules dendritiques.

5.2) Les cellules dendritiques (DC)

Découvertes en 1868 lors d'une étude anatomique de la peau par Paul Langerhans, les DC ont été les premières cellules découvertes du système immunitaire. Le nom de cellule dendritique vient du fait qu'elles sont couvertes d'un écheveau de longues extensions membranaires semblables aux dendrites des cellules nerveuses.

Les cellules dendritiques jouent un rôle clé dans l'immunité. Il s'agit de Cellules Présentatrices d'Antigène qui exercent la fonction de sentinelles. Elles forment un réseau très dense idéalement placé pour collecter les allergènes présents dans l'air. Les DC étendent leurs dendrites à travers la couche de cellules épithéliales pour sonder la lumière des alvéoles pulmonaires tout en maintenant la fonction de barrière grâce à la formation de jonctions serrées de type claudine-1, claudine-2 ou zonula-occludine-1 (ZO1) (**Figure 12**).



Nature Reviews | Immunology

Figure 12: Représentation schématique du lien entre les cellules épithéliales et les cellules dendritiques. Les DC étendent leurs dendrites à travers la couche de cellules épithéliales tout en maintenant la fonction de barrière des cellules épithéliales en formant des jonctions serrées (claudine-1/2 ou zonula-occludine-1) (Hammad and Lambrecht 2008).

Les cellules dendritiques expriment une large variété de récepteurs de PRR tels que les TLR, les NLR, des C-type lectin receptor et des récepteurs PAR. Elles expriment aussi des récepteurs pour des médiateurs de l'inflammation qui sont libérés après un dommage tel que les prostaglandines, l'ATP, l'acide urique (Hammad and Lambrecht 2011).

Les DC peuvent être réparties en plusieurs sous-populations en fonction de leur origine, leur localisation et leur fonction (**Figure 13**). Chez la souris, toutes les DCs expriment en grande quantité CD11c (MHCII^{hi} CD11c^{hi}).

- Il existe un fort réseau de cellules dendritiques résidentes intra épithéliale MHCII^{hi} CD11c^{hi}CD11b⁻ capables de projeter leur dendrites dans le lumen. Dans la lamina propria, on trouve des cellules dendritiques résidentes MHCII^{hi} CD11c^{hi}CD11b⁺, source riche de chimiokines proinflammatoires comme CCL17 et CCL22.

- Les cellules dendritiques interstitielles sont obtenues par digestion enzymatique de la région distale des poumons. Ces cellules sont soit CD11c^{hi}CD11b⁻ soit CD11c^{hi}CD11b⁺. Elles sont nommées cDC (cellules dendritiques conventionnelles) par opposition aux pDC CD11c^{int} (cellules dendritiques plasmacytoïdes), dont la localisation n'est pas parfaitement identifiée. Les cDC constituent un petit sous-ensemble qui possède la capacité de détecter les lésions tissulaires, de capturer, dégrader et présenter les antigènes aux lymphocytes T. Les pDC s'accumulent dans le sang et les tissus lymphoïdes et entrent dans les ganglions lymphatiques via la circulation sanguine (Merad, Sathe et al. 2013).

- Les cellules dendritiques alvéolaires, facilement accessibles par lavage bronchoalvéolaire sont des cellules CD11c^{hi}MHC^{hi}.

Il existe une sous-population de cellules appelée IKDC (interferon-producing-killer dendritic cells) qui peut être recrutée dans les voies respiratoires. La combinaison des fonctions associées à des cellules NK et à des DC a doté les IKDC d'un pouvoir antitumoral remarquable. En effet, elles ont à la fois la capacité d'effectuer la cytololyse comme les cellules NK mais également de présenter les antigènes comme les DC. De plus, la faculté des IKDC de limiter la croissance tumorale est plus importante que celle des NK.

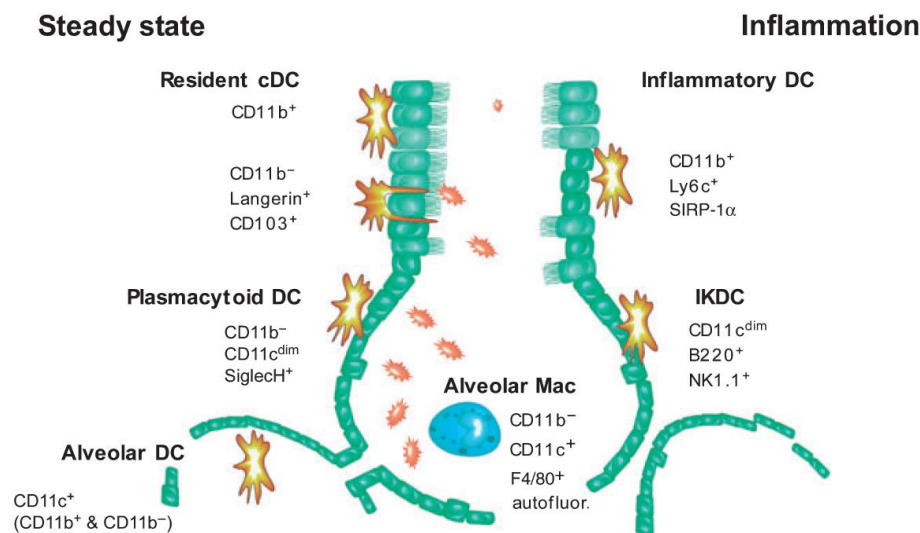


Figure 13: Sous population de cellules dendritique dans le poumon en condition homéostatique d'une part et en condition inflammatoire d'autre part. Physiologiquement présentent dans les poumons, de nouvelles population de DC sont recrutées en cas d'inflammation (Hammad and Lambrecht 2011)

Certains allergènes induisent la production d'espèces réactives oxygénées (ROS, Reactive Oxygen Species) qui activent les cellules dendritiques ou les cellules épithéliales. Les « ROS » se lient aux protéines et lipides présents sur la membrane cellulaire, créant des lésions cellulaires ou conduisant à la formation de métabolites hautement réactifs, les aldéhydes. Ceci a pour conséquence l'activation de la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-Activated Protein kinase) incluant ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (C-Jun N-terminal Kinase) et la protéine kinase p38. Cette voie de signalisation active des facteurs de transcription tels que NF-κB qui conduit à la sécrétion de cytokines, à la régulation de facteur de costimulation et à la migration des cellules dendritiques (**Figure 14**) (Robays, Maes et al. 2009).

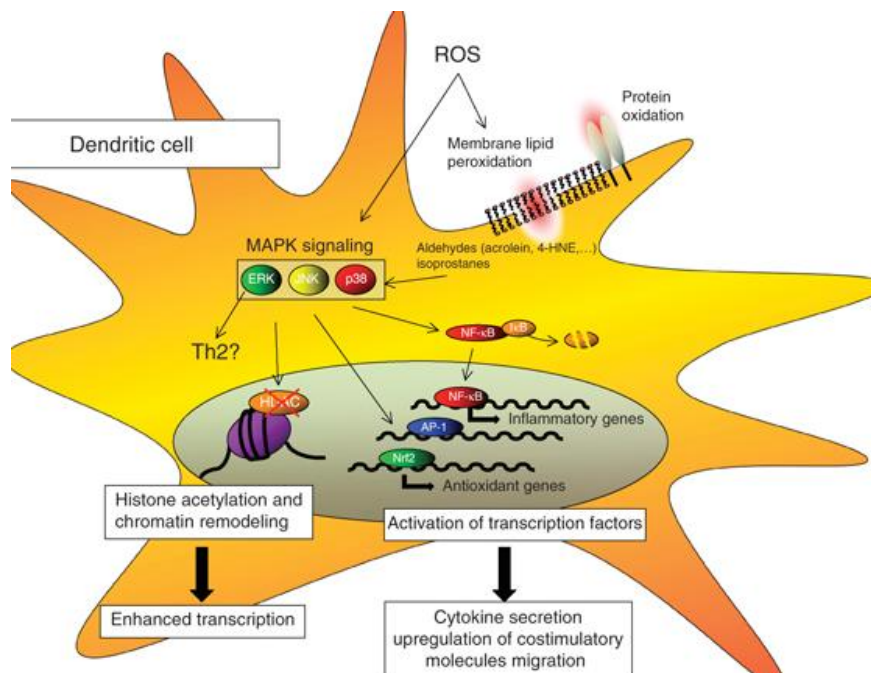


Figure 14: Représentation schématique de l'activation des cellules dendritiques. Des espèces réactives oxygénées (ROS) activent les cellules dendritiques. Cette activation s'effectue grâce à la voies de signalisation des MAPK (Mitogen-Activated Protéines Kinases) qui active des facteurs de transcriptions comme NF-κB conduisant à la sécrétion de cytokines, la régulation de facteur de co-stimulation et à la migration des cellules dendritiques (Robays, Maes et al. 2009).

On a longtemps pensé qu'il y avait un renouvellement important et rapide des DC en raison de la quantité de cellules qui migrent vers les ganglions lymphatiques médiastinaux. Ceci a été démontré dans une étude où des traceurs fluorescents comme le FITC-dextran ou le FITC-OVA ont été capturés par les DC et transportés dans les ganglions médiastinaux en condition homéostatique. Cela sous-entendait que la migration des DC avait lieu même en absence de dommage cellulaire ou d'inflammation dans les poumons (Hammad and Lambrecht 2011). Cependant, cela relevait plus du fait que les manipulations avaient été réalisées chez la souris ou bien que les traceurs étaient contaminés par de faible quantité d'agonistes de TLR, étant ainsi reconnu comme un signal de danger par les DC. En effet, cette hypothèse fut réfutée en 2008, lorsqu'une équipe a démontré en utilisant des souris reporter MLysCre qu'une population majeure de DC était retrouvée dans les ganglions lymphatiques seulement après l'introduction d'un stimulus inflammatoire (Jakubczik, Bogunovic et al. 2008).

Les DC catabolisent les antigènes qu'elles ont capturés et les dégradent en peptides antigéniques qu'elles présentent à leur surface grâce au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) aux récepteurs des cellules T (TCR) (Figure 15). Les cellules T capables de se lier au complexe CMH-peptide reçoivent alors un signal de survie. L'engagement du TCR induit l'expression de la glycoprotéine membranaire CD40 ligand (CD40L ou CD154), un marqueur précoce d'activation lymphocytaire de la famille du

TNF. L'interaction du CD40L des cellules T avec le CD40 exprimé à la surface des DC induit une augmentation de l'expression de CD80/CD86 entraînant un renforcement du signal induit par CD28/B7. Plusieurs autres voies permettent l'activation des cellules T telles que la reconnaissance de ICOS (inducible co-stimulatory molecule) et OX40 exprimés par les cellules T et leurs ligands respectifs ICOS-L et OX40L exprimés par les DC (Yang and Huang 2011).

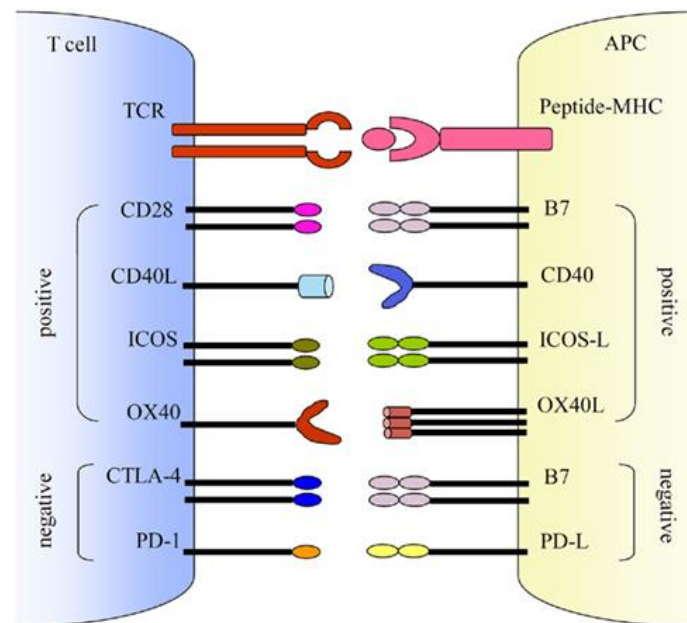


Figure 15: Représentation de la synapse immunologique entre les DC et les cellules T et leurs marqueurs de co-stimulation. (Yang and Huang 2011).

Les cellules dendritiques jouent un rôle crucial dans l'asthme allergique. En effet, il a été démontré que la déplétion des DC dans un modèle murin d'asthme induit par l'ovalbumine inhibe l'hyperréactivité bronchique des souris et que la réplétion des DC restaure le phénotype asthmatique de ces animaux (Gill 2012). De plus, l'allergène d'acarien HDM induit directement la libération de cystéinyl leucotriènes par les cellules dendritiques via le PRR Dectin-2.

5.3) Les macrophages

Initialement découverts par Elie Metchnikoff en 1883 comme des cellules phagocytaires mononuclées, appartenant au sous-groupe des leucocytes. Les macrophages sont des cellules retrouvées dans tous les tissus des mammifères adultes où ils présentent une grande diversité anatomique et fonctionnelle.

Dans les tissus, les macrophages sont organisés en motif défini où chaque cellule occupe son propre territoire. Tout comme les DC, les macrophages constituent un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative en reconnaissant les éléments étrangers internalisés (Guilliams, Bruhns et al. 2014).

Les macrophages sont issus des monocytes ayant quitté la circulation sanguine pour entrer dans les tissus. Ils se distinguent des DC par leur expression de F4/80, CD11b et de récepteurs au fragment Fc. De plus, contrairement aux DC qui servent de principaux inducteurs à la réponse adaptative des cellules T, les macrophages en condition normale participent au maintien de l'homéostasie et possèdent une activité protéolytique et catabolique. En effet, ils sont davantage qualifiés dans l'ingestion de pathogènes par phagocytose, dans l'élimination des débris cellulaires et des cellules apoptotiques, dans la production de facteurs de croissance et dans le remodelage des tissus après un dommage (Galli, Borregaard et al. 2011).

Tout comme les DC, les macrophages jouent un rôle de sentinelle dans la surveillance immunitaire. En effet, ils expriment également des PRR qui identifient les PAMPs et les DAMPs exprimés par les pathogènes microbiens ou durant un stress cellulaire. Les macrophages produisent ainsi une variété de médiateurs qui recrutent les neutrophiles et induisent une inflammation.

Les macrophages peuvent être classés en sous-ensembles en fonction de leur localisation et de leurs fonctions. Les macrophages tissu-résidents incluent les macrophages alvéolaires dans les poumons, les histiocytes dans les tissus conjonctifs interstitiels, les ostéoclastes dans les os, la microglie dans le cerveau, les macrophages intestinaux et les cellules de Kupffer dans le foie par exemple (Galli, Borregaard et al. 2011) (Figure 16).

Les sous-ensembles de monocytes mononucléaires dans la circulation peuvent se différencier en macrophages tissulaires après être entré dans les différents sites anatomiques. Quand ils sont activés par les stimuli appropriés, ces cellules se différencient en plusieurs sous-ensembles avec des phénotypes et des caractéristiques fonctionnelles distinctes.

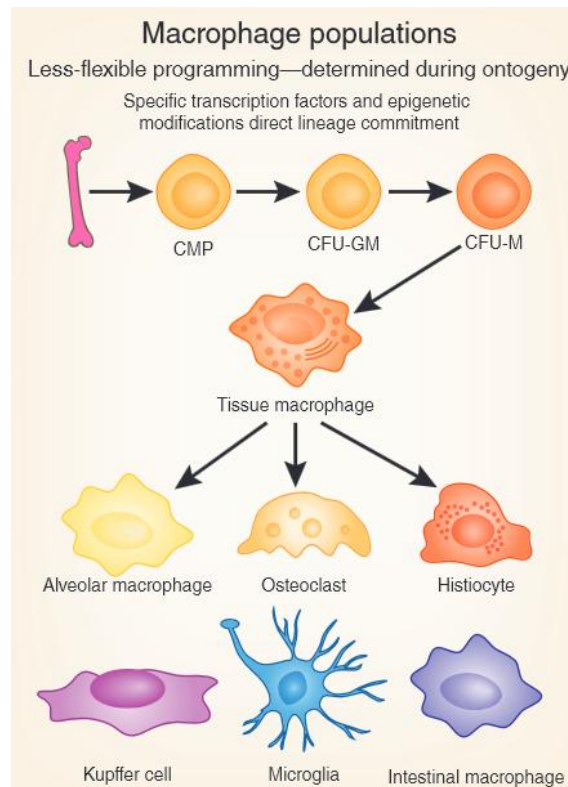


Figure 16: Classification des populations de macrophage. Les macrophages peuvent être classés en population spécifique en se basant sur leur localisation dans l'organisme (Galli, Borregaard et al. 2011).

Cependant, les marqueurs phénotypiques ne permettent pas totalement la discrimination des macrophages en sous-ensembles. Il existe une autre approche qui consiste à définir les macrophages sur la base de leur phénotype fonctionnel (**Figure 17**).

- Les macrophages activés classiquement (macrophages M1) qui contrôlent la réponse de l'hôte et l'immunité anti-tumorale. Ils ont des capacités accrues pour la phagocytose et la présentation d'antigènes mais également pour la production de cytokines Th1 comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α (Liu, Zou et al. 2014).
- Les macrophages activés alternativement par stimulation (macrophages M2 ou AAM, alternatively activated macrophages) participent à la sécrétion de facteurs pro-fibrotiques, à la persistance des pathogènes ainsi qu'à l'exacerbation du remodelage bronchique. Ils sont activés par des cytokines Th2 comme l'IL-4 ou l'IL-13 (Liu, Zou et al. 2014).
- Les macrophages interstitiels (IM) sécrètent de l'IL-10 (Galli, Borregaard et al. 2011).
- Les macrophages associés aux tumeurs suppriment l'immunité tumorale.
- Le sous-ensemble de monocytes appelé MDSCs (myeloid-derived-suppressor cells) fonctionnellement similaire aux macrophages associés aux tumeurs.
- Les macrophages alvéolaires, une fois activés jouent un rôle proinflammatoire.

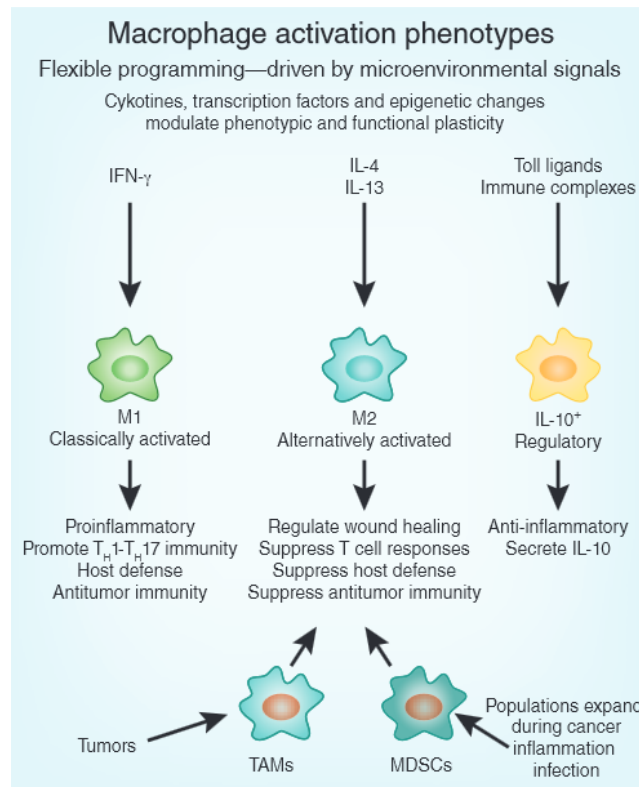


Figure 17: Classification des macrophages selon leur phénotype fonctionnel (Galli, Borregaard et al. 2011).

Plusieurs voies de signalisations sont engagées dans la polarisation des macrophages en M1 ou M2 (**Figure 18**). La polarisation en macrophage M1 inclut STAT1 régulé par le récepteur de l'IFN gamma (IFN γ R), l'augmentation de l'expression de IRF5, NF κ B et AP-1 régulés par TLR4 tandis que la polarisation en macrophage M2 implique STAT6 et IRF4 dont l'activation nécessite le récepteur de l'IL-4 (IL-4R α), l'augmentation de PPAR γ régulé par le récepteur d'acide gras (fatty acid receptor) et l'augmentation de CREB régulé par TLR4. De plus, il existe un rétrocontrôle entre les macrophages M1 et M2 mis en œuvre par STAT1-STAT6, IRF5-IRF4, AP1-CREB et AP1- PPAR γ qui jouent un rôle dans l'initiation, le développement et la cessation des maladies inflammatoires (Liu, Zou et al. 2014).

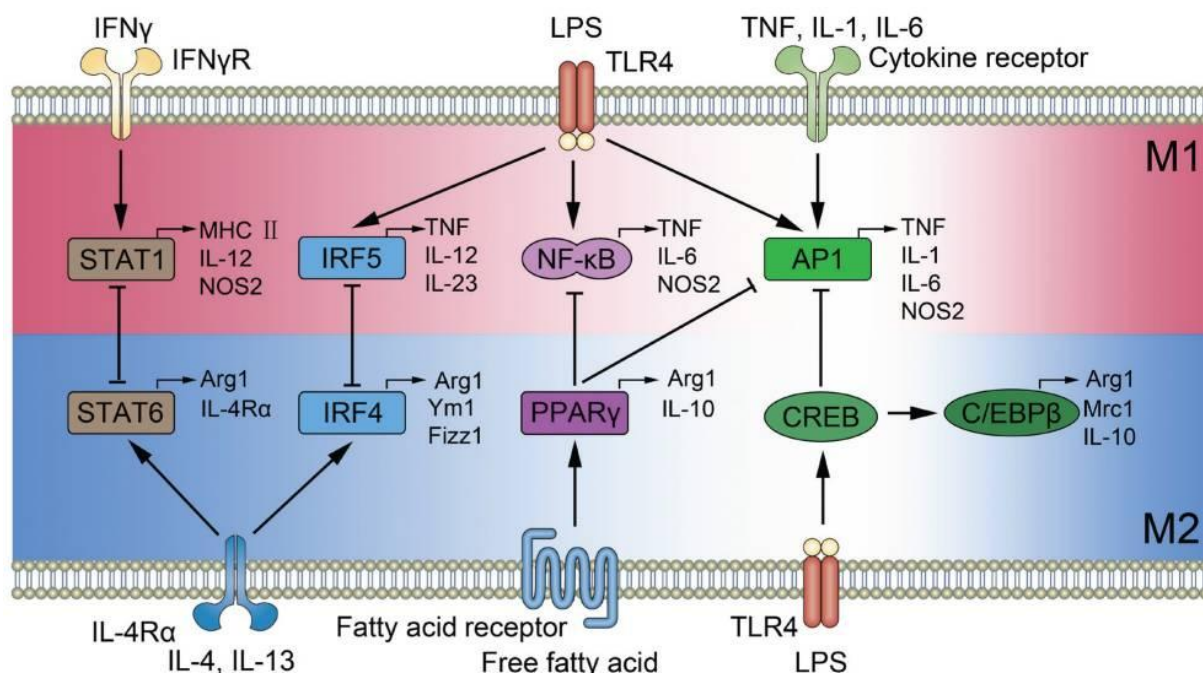


Figure 18: Différentes voies de signalisation permettent la polarisation des macrophages en M1 ou M2 (Liu, Zou et al. 2014).

Les macrophages jouent un rôle fondamental dans l'asthme. En effet, il a été démontré qu'une dérégulation dans le phénotype des macrophages pulmonaires contribuait à la pathogénèse de l'asthme (Moreira and Hogaboam 2011). La polarisation des macrophages M1 et M2 reste controversée selon les pathologies impliquées puisqu'elle dépend du taux de cytokines polarisantes (IL-4, IL-13, IFN- γ par exemple). Lors de la réponse allergique, l'IL-4 et l'IL-13 produites par les cellules Th2 dans les poumons contribuent à l'activation des macrophages M2. Du fait de l'exposition au LPS et à l'IFN- γ , les macrophages M1 sont aussi présents dans l'asthme allergique. Durant la phase d'activation les macrophages M1 et M2 libèrent des cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et des facteurs qui contribuent au recrutement cellulaire, à l'activation et à la survie des cellules inflammatoires. Les cellules apoptotiques dans les poumons contribuent à la libération d'IL-10 et de TGF- β par les macrophages, favorisant ainsi l'activation des Treg (regulatory T cells) et inhibant les réponses inflammatoires.

5.4) Les lymphocytes

Une réponse immune efficace implique deux types de cellules : les cellules présentatrices d'antigène, détaillées précédemment, et les lymphocytes. Les lymphocytes quittent la moelle osseuse puis circulent dans le sang et les systèmes lymphatiques et résident dans les organes lymphoïdes.

Il existe deux populations essentielles de lymphocytes : les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les précurseurs des lymphocytes T vont migrer dans le thymus où ils vont se différencier en lymphocytes T matures. Dans les tissus lymphoïdes, ils vont acquérir des fonctions effectrices. Les lymphocytes T sont subdivisés en lymphocytes T CD4 ou en lymphocytes T CD8. Les lymphocytes T CD4 sont activés par des fragments antigéniques présentés par le CMH de classe II des DC. Une fois activés, les lymphocytes T CD4 prolifèrent et se différencient. La destinée de la cellule est différente en fonction des cytokines produites par les cellules présentatrices d'antigène qui l'active. Les cellules T sont subdivisées en plusieurs types : les lymphocytes T auxiliaires ou T helper (Th1, Th2, Th17, Th22), les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les «Natural Killer T » (NKT), chacune de ces populations jouant un rôle complexe dans le développement de l'asthme allergique. Les lymphocytes T CD8 en revanche sont activés par des fragments antigéniques présentés par des molécules du CMH de classe I exprimé par les cellules nucléées de l'organisme. Les lymphocytes T CD8 circulent à l'état pré-cytotoxique et reçoivent des signaux d'activation pour devenir cytotoxiques.

5.4.1) Les lymphocytes B

Une fois arrivés à maturation, les lymphocytes B quittent la moelle osseuse. Ils expriment alors à leur surface des récepteurs de liaison à l'antigène spécifique appelés BCR (B cell antigen receptor). Lorsque le BCR entre en contact avec son antigène spécifique, plusieurs signaux sont générés conduisant à l'activation, la différenciation et la formation des lymphocytes B mémoires et des cellules B effectrices appelées plasmocytes (Tobón, Izquierdo et al. 2013). Les cellules B mémoires ont une durée de vie plus longue et expriment le même anticorps membranaire que la cellule B naïve dont elles sont issues. Les plasmocytes produisent des anticorps sous forme sécrétée et n'expriment que peu ou pas de formes membranaires (Figure 19) (Wu and Zarrin 2014).

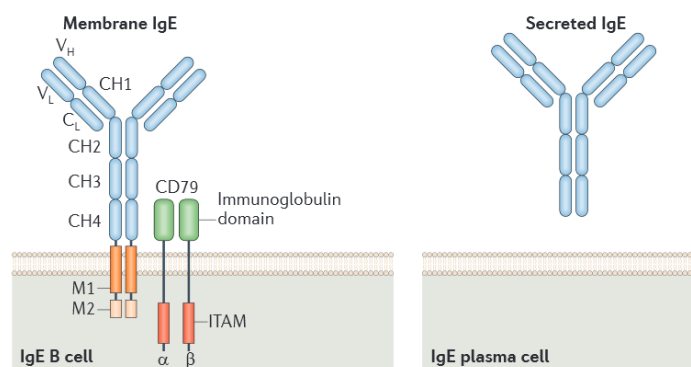


Figure 19: Immunoglobuline E produite par les lymphocytes B (forme membranaire) et les plasmocytes (forme sécrétée) (Wu and Zarrin 2014).

Lors de la réponse immune observée en cas d'asthme, deux signaux sont nécessaires à la production d'immunoglobuline E par les lymphocytes B. L'IL-4 produite par les cellules Th2 constitue un premier signal lorsqu'elle est captée par les lymphocytes B et stimule un changement d'isotype et la synthèse de la chaîne lourde des IgE. Le second signal est l'interaction du CD40L exprimé par les cellules T avec le CD40 exprimé par les lymphocytes B. Ceci stimule le réarrangement V(D)J permettant la production d'IgE spécifique de l'allergène et l'expansion clonale des cellules B (Lindell, Berlin et al. 2008). Ces IgE produites se fixent sur les récepteurs FcεRI des mastocytes et des éosinophiles. L'allergène se fixe sur ces récepteurs entraînant la dégranulation de médiateurs pré-formés par les mastocytes et les éosinophiles (Figure 6).

Durant les 30 dernières années, plusieurs travaux ont démontrés que les cellules B pouvaient avoir des fonctions de régulation négatives et réduisaient l'inflammation dans certaines maladies. En effet, l'absence ou la perte des lymphocytes B régulateurs (B10, Br3, Breg) exacerbe les symptômes des maladies allergiques (anaphylaxie) et autoimmunes (encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), colites chronique, arthrite induite par le collagène, modèle de lupus) (Noh and Lee 2011). Les lymphocytes B régulateurs sont caractérisés par la production des cytokines IL-10 (Br1 ou B10) et TGF-β (Br3) ou la régulation de l'expression de Foxp3 (Breg) (Figure 20).

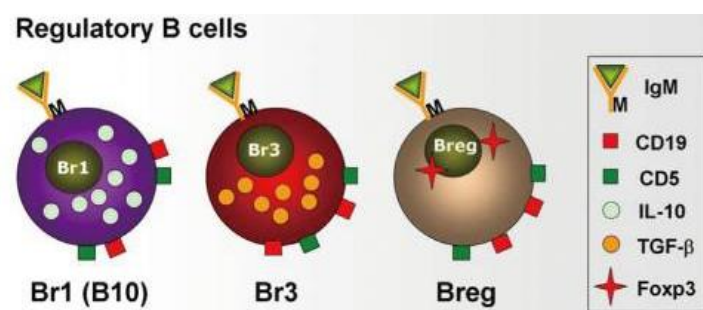


Figure 20: Populations de lymphocyte B régulateurs (B10, Br3, Breg) (modifié d'après (Noh and Lee 2011)).

D'autres études ont montré que les lymphocytes B régulateurs ont un rôle protecteur dans l'asthme allergique. En effet, les cellules B10 réduisent l'hyperréactivité bronchique, diminuant ainsi l'inflammation pulmonaire. Les lymphocytes B régulateurs suppriment l'inflammation des voies respiratoires en induisant un recrutement des Treg (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) dans les poumons de manière TGF-β-indépendante (Amu, Saunders et al. 2010). Ainsi les cellules Treg et les Breg régulent toutes deux négativement les maladies allergiques comme l'asthme.

5.4.2) Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Le terme de cellules régulatrices se réfère aux cellules qui contrôlent ou suppriment activement les fonctions d'autres cellules. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) contrôlent le développement des maladies autoimmunes et le rejet d'organes transplantés mais ils jouent également un rôle important dans le contrôle de l'asthme et de l'allergie (**Figure 4**) (Holgate 2012) (Akbari, Stock et al. 2003). Le faible développement des lymphocytes T régulateurs due à l'excès d'hygiène dans les premiers mois de vie serait en cause dans la recrudescence de l'asthme allergique dans les pays développés ces vingt dernières années (Mamessier, Botturi et al. 2005).

Trois types de lymphocytes T régulateurs ont été décrits : Les Tr1, les Th3 et les Treg (**Figure 21**). Les lymphocytes Tr1 ont une faible capacité proliférative et produisent un taux important d'IL-10, un faible taux d'IL-2 et ne produisent pas d'IL-4. Les lymphocytes Tr1 suppriment la prolifération des cellules TCD4⁺ en réponse à un allergène et préviennent l'induction de colites expérimentales (Akbari, Stock et al. 2003). Les lymphocytes Th3 sont des résidents du tube digestif et ont pour fonction de produire la cytokine immunorégulatrice TGF- β (Noh and Lee 2011). Leur rôle est de maintenir un état de tolérance dans l'intestin. Cependant, l'existence de telles cellules au niveau bronchique a été souvent évoquée mais jamais confirmée.

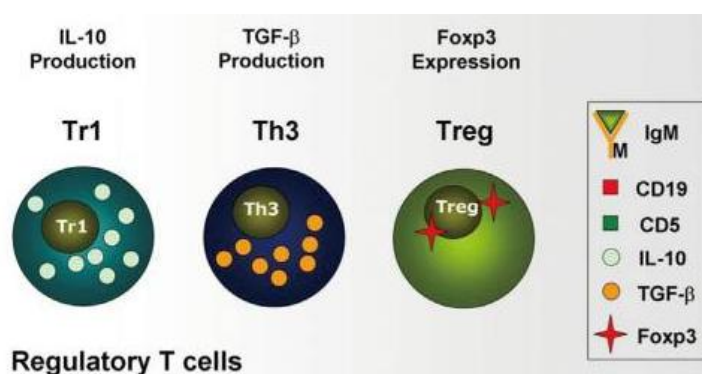


Figure 21: Populations de lymphocytes T régulateurs (Tr1, Th3, Treg) (modifié d'après (Noh and Lee 2011)).

Il a été démontré que le transfert de lymphocyte Treg CD4⁺ CD25⁺ supprime l'inflammation allergique et l'hyperactivité via un mécanisme IL-10-dépendant. Les lymphocytes Treg jouent un rôle crucial dans l'asthme allergique. En effet, ils influencent plusieurs voies de signalisation dans le processus allergique en sécrétant de l'IL-10 et du TGF- β pour contrôler (**Figure 4**) (Holgate 2012) :

- La suppression des DC impliquées dans la programmation des cellules T effectrices.

- L'inhibition des mastocytes, basophiles et éosinophiles.
- La prévention de la migration des cellules T dans les tissus cibles.

De plus, les Tr1 comme les Treg induisent la production d'IgG4 capables de supprimer la réponse allergique via des domaines intracellulaires, les ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) (van de Veen, Stanic et al. 2013) (Holgate 2012). Ces ITIM induisent l'agrégation des récepteurs aux IgG de faible affinité FcγRIIB et FcγRIIA sur les mastocytes et les basophiles empêchant la liaison de l'allergène aux IgE et la dégranulation des mastocytes (Holgate 2012), (Cady, Powell et al. 2010). Ainsi, les lymphocytes T régulateurs sont au cœur de la régulation du contrôle de l'immunité. Une dérégulation de ces cellules pourrait entraîner une perte de tolérance et la mise en place d'une réponse immune allergique.

5.4.3) Les lymphocytes T helper (Th1, Th2)

Dans les années 1990, le paradigme Th2 dans l'allergie s'est installé devenant progressivement le dogme Th2 selon lequel l'ensemble des pathologies allergiques peut s'expliquer uniquement par la différenciation des lymphocytes T spécifiques de l'allergène en lymphocytes producteurs d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-5. Cependant, il apparaît clairement que ce simple fait n'est pas uniquement à l'origine de réactions inflammatoires relativement complexes et variées (Mamessier, Botturi et al. 2005).

Les lymphocytes Th1 et Th2 ont été découverts en 1986 par Mossman et Coffman chez la souris puis chez l'homme (Mamessier, Botturi et al. 2005). Initialement identifiés comme des lymphocytes T CD4+, ils se distinguent par le type de cytokines produites. La différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocyte Th1 ou Th2 se fait après l'interaction entre le TCR des cellules T CD4 naïves et le CMH-II des DC (**Figure 22**) (Endo, Hirahara et al. 2014). Bien que les lymphocytes Th0 ne constituent pas à proprement parler d'une population cellulaire capable de se différencier en une autre. Il s'agit d'une cellule T CD4 activée en l'absence de cytokine.

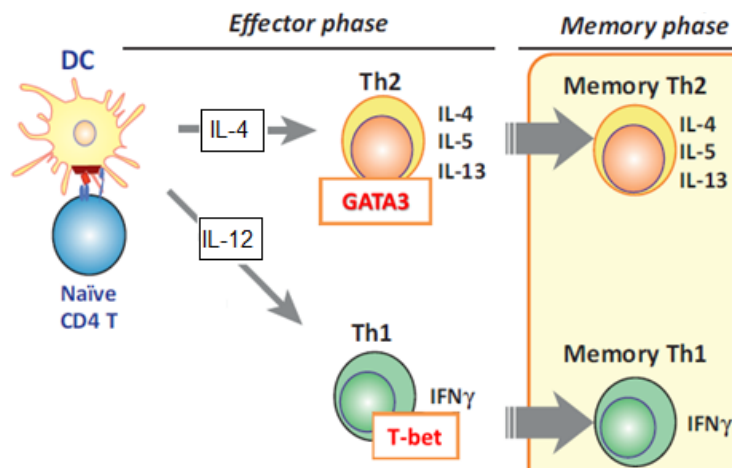


Figure 22 : Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocytes Th1 ou Th2 durant la phase effectrice de la réponse allergique puis développement des cellules lors de la réponse mémoire (modifié d'après (Endo, Hirahara et al. 2014), (Walsh and Mills 2013) et (Hall and Agrawal)).

Les lymphocytes Th1 sont obtenus en présence d'IL-12 et sont producteurs d'IFN- γ sous la dépendance du facteur de transcription T-bet (Endo, Hirahara et al. 2014), (Walsh and Mills 2013) et (Hall and Agrawal). Ils sont induits en réponse à une infection virale, bactérienne ou protozoaire. L'IFN- γ est une cytokine impliquée dans les mécanismes d'activation des lymphocytes T cytotoxiques, CD8⁺ et NK qui tuent les cellules infectées par des virus (Lambotin, Raghuraman et al. 2010). Il a un effet sur plusieurs cellules de l'immunité innée comme l'activation de macrophages afin d'éliminer les pathogènes intracellulaires soit par production d'oxyde nitrique (NO, nitric oxide) soit par d'autres mécanismes. Les lymphocytes Th1 aident également les cellules B à produire des anticorps comme l'IgG2a chez la souris, impliquée dans l'opsonisation (recouvrement de la membrane des cellules infectées pour favoriser leur phagocytose), la fixation du complément et la neutralisation de virus (Walsh and Mills 2013).

Les lymphocytes Th2 sont obtenus en présence d'IL-4 et sécrètent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 sous la dépendance du facteur de transcription GATA3 (Endo, Hirahara et al. 2014), (Walsh and Mills 2013) et (Hall and Agrawal). Ces cytokines jouent un rôle clé dans l'asthme allergique. En effet, l'IL-4 induit la production d'IgE par les cellules B et l'expression de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) par les cellules endothéliales. L'IL-5 est cruciale dans l'activation et la migration des éosinophiles dans les poumons, l'IL-13 est associée à divers événements importants lors de la phase effectrice de l'asthme comme l'hyperréactivité bronchique (AHR, airway hyper-reactivity), l'hypersécrétion de mucus (production de Mucine 5AC par les cellules en gobelet) et le remodelage bronchique (Endo, Hirahara et al. 2014). Des études récentes ont identifiés des sous-ensembles de cellules Th2 mémoires qui produisent une grande quantité d'IL-5, d'IL-17 ou d'IFN- γ en plus de l'IL-4 et de l'IL-13 (Figure 23).

Les cellules Th2 productrices d'IL-5 jouent un rôle dans l'éosinophilie et sont caractérisées par l'expression de CCR4 (chemokine (C-C motif) receptor 4) et T1/ST2, les récepteurs

respectifs de CCR8 et de l'IL-33. Les cellules productrices d'IL-17 jouent quand à elles un rôle dans l'inflammation chronique et sont identifiées comme une population cellulaire CCR6⁺ et CCR8⁺ (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 lymphocytes) dans les voies respiratoires. Enfin, les cellules Th2 qui produisent l'IFN- γ (Th2+1) jouent un rôle important dans la protection contre les infections virales et sont générées par stimulation avec l'IFN- γ de type I. De plus, il existe d'autres cellules Th2 mémoires dites « hybrides » cruciales dans les mécanismes des pathologies allergiques (Endo, Hirahara et al. 2014).

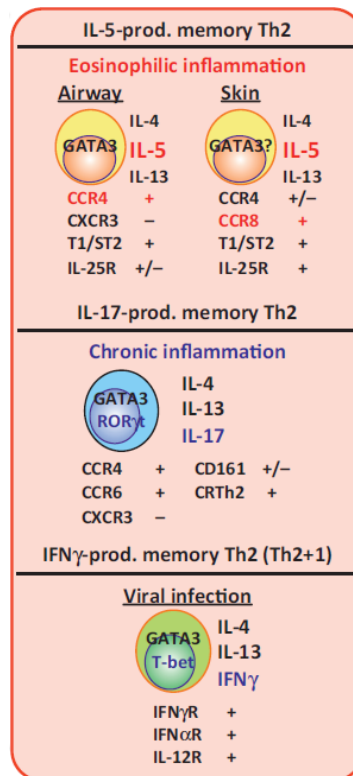


Figure 23: Diversité des cellules Th2 mémoires, sous-ensembles de cellules Th2 mémoires qui produisent une grande quantité d'IL-5, d'IL-17 ou d'IFN- γ en plus de l'IL-4 et de l'IL-13 (Endo, Hirahara et al. 2014).

5.4.4) Les lymphocytes T helper (Th9, Th17, Th22)

Durant les 10 dernières années, trois sous-types de lymphocytes T helper ont été découverts et désignés: Th9, Th17 et Th22 selon les cytokines qu'ils sécrètent c'est-à-dire respectivement l'IL-9, l'IL-17 et l'IL-22 (Schmitt, Klein et al. 2014).

Parmi ces trois populations, les lymphocytes Th17, découverts en 2005, sont certainement les plus étudiés. Ils sont obtenus en présence d'IL-6 et de TGF- β et produisent d'autres cytokines en dehors de l'IL-17 et de l'IL-17F comme l'IL-8, l'IL-21, l'IL-22, l'IL-23, le TNF- α et le GM-CSF (Granulocyte-Monocyte Colony Stimulatory Factor) (Hall and Agrawal)

(Cosmi, Santarlasci et al. 2014). La différenciation en lymphocyte Th17 conduit à l'expression du facteur de transcription ROR γ t (Figure 24).

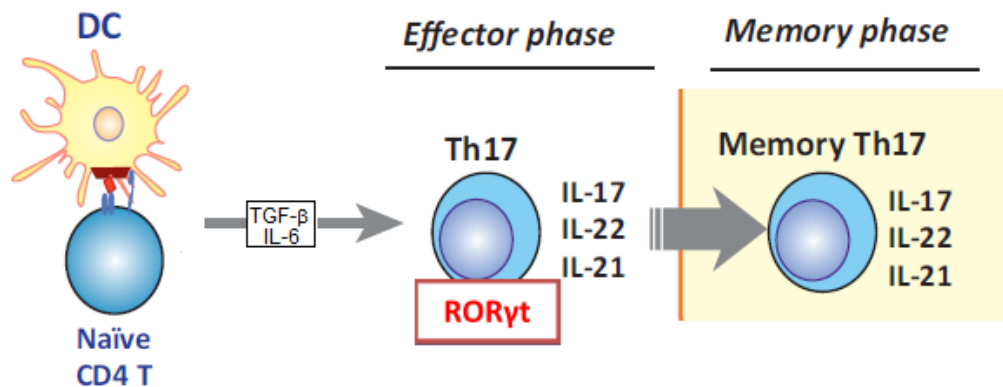


Figure 24 : Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocyte Th17 durant la phase effectrice de la réponse allergique puis développement des cellules lors de la réponse mémoire (modifié d'après (Endo, Hirahara et al. 2014), (Walsh and Mills 2013) et (Hall and Agrawal)).

Ces lymphocytes ont une activité protectrice due à leur capacité d'induire l'expression de bêta défensine 2 (peptides antimicrobiens) au niveau de l'épithélium pulmonaires et de mucine dans les bronches. Cependant, les lymphocytes Th17 ont également un rôle pathogénique chez l'homme en condition inflammatoire chronique lorsque l'inflammation induite par un pathogène inconnu ne peut pas être réduite par le système immunitaire (Cosmi, Santarlasci et al. 2014). Ils sont associés à de nombreuses pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, la sclérose multiple, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le psoriasis et l'asthme. En effet, les cellules Th17 sont connues pour leur implication dans le recrutement de neutrophiles dans les maladies auto-immunes, le psoriasis et l'asthme via la production de CXCL8, une chimiokine attractante des neutrophiles dont l'expression est très élevée dans l'asthme sévère (Holgate 2012). Les lymphocytes Th17 exercent également leurs effets pro-inflammatoires par l'intermédiaire des cytokines qu'ils sécrètent puisque l'IL-17 contribue à l'induction de la réponse Th2 et au recrutement des éosinophiles dans l'asthme allergique chez la souris (Song, Luo et al. 2008).

Les lymphocytes Th9 ont été définis par Veldhoen et al et Dardalhon et al en 2008 et les lymphocytes Th22 en 2009 par deux équipes indépendantes (Duhon et al et Trifari et al) à partir du sang périphérique de volontaires sains. Les lymphocytes Th9 et Th22 se démarquent par l'absence d'expression des facteurs de transcription classiques des Th1, Th2, Th17 ou Treg.

Les lymphocytes Th9 sont obtenus en présence d'IL-4 et de TGF- β . En absence d'IL-4, le TGF- β favorisera le développement des lymphocytes Treg. L'induction des Th9 requière donc les signaux des deux récepteurs. Ainsi, l'activation de STAT6 par IL-4 est indispensable au développement des Th9 (Perumal and Kaplan 2011). De plus, contrairement aux cellules Th2, les lymphocytes Th9 n'expriment que faiblement le facteur de transcription GATA3. Le facteur de transcription qui permet le « switch » vers un phénotype Th2 ou Th9 est PU.1 (Figure 25) (Wambre, James et al. 2012). Il s'agit d'un facteur qui induit la production d'IL-9 en se liant directement à son promoteur.

Des études sur un modèle d'inflammation pulmonaire induit par l'ovalbumine ont montré que la neutralisation des lymphocytes Th9 réduisait fortement les symptômes de l'asthme allergique. Des résultats similaires sont observés chez des animaux ayant des cellules T déficientes pour le domaine ETS (encoded by the *Sfpi1* gene) du facteur de transcription PU.1 (Schmitt, Klein et al. 2014). De plus, l'IL-9 produite par ces cellules favorise l'asthme allergique en induisant la production d'IL-13 et d'éotaxine, une chimiokine attirant les éosinophiles (Wambre, James et al. 2012). Chez les patients asthmatiques, la production d'IL-9 dans les poumons est directement corrélée au taux d'immunoglobuline E. Il est donc clairement établi que les lymphocytes Th9 participent activement à la réponse allergique.

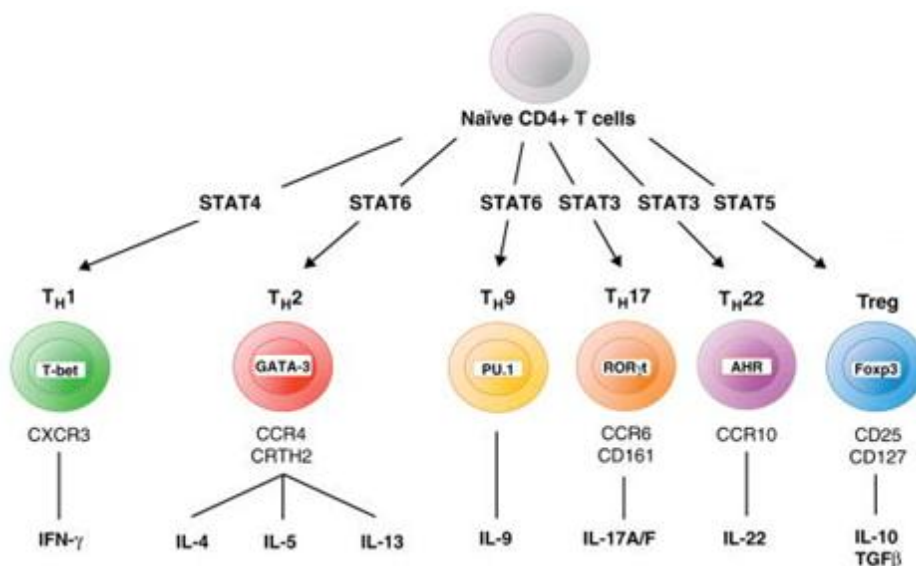


Figure 25 : Schéma récapitulatif de la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocytes Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 ou Treg. Chaque population cellulaire exprime des facteurs de transcriptions et produit des cytokines différentes (Modifié d'après (Wambre, James et al. 2012)).

Les lymphocytes Th22 produisent comme leur nom l'indique de l'IL-22, cependant ils sont incapables de produire de l'IL-4, de l'IL-17 ou de l'IFN- γ . L'IL-22 peut exercer des fonctions diverses selon l'environnement inflammatoire. En effet, elle peut avoir un rôle

protecteur dans certaines inflammations bactériennes intestinales ou pulmonaires (Liang, Tan et al. 2006) (Zheng, Danilenko et al. 2007) ou pro-inflammatoire dans plusieurs pathologies de la peau puisqu'elle peut provoquer l'hyperplasie de l'épiderme (Wambre, James et al. 2012). Il a été démontré que l'effet pro-inflammatoire de l'IL-17 dépendait partiellement de l'IL-22 puisque la neutralisation de l'IL-17 chez des souris déficientes pour l'IL-22 exacerbe la réponse inflammatoire pulmonaire allergique (Besnard, Sabat et al. 2011). Ainsi, il existe une balance entre l'IL-17 et l'IL-22 dans l'asthme allergique.

5.4.5) Les Natural Killer (NK)

Les cellules tueuses naturelles ou NK (Natural killer) sont nommées ainsi en raison de leur capacité spontanée à lyser les cellules tumorales ou infectées par des pathogènes (en théorie toutes les cellules dépourvues de CMH de classe 1) en absence d'immunisation spécifique préalable. Ces cellules sont des composants de l'immunité innée et sont dépourvues de récepteurs spécifiques d'antigènes (Vivier, Ugolini et al. 2012). Les NKT sont présents dans la circulation sanguine, dans les organes lymphoïdes et dans certains tissus comme le foie, le poumon, le placenta. Elles ont la particularité de jouer un rôle dans la modulation de l'activité des cellules T dans certaines maladies auto-immunes comme le diabète de type 1 et la sclérose multiple. Cependant, elles présentent également un rôle dans l'asthme allergique.

Il existe une population de NKT particulièrement étudiée dans l'asthme. Il s'agit des iNKT (invariant NKT) qui expriment un TCR invariant ($V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ chez l'homme ou $V\alpha 14$ - $J\alpha 281$ chez la souris) (Akbari, Stock et al. 2003). Le ligand des iNKT le plus connu est l' α -galactosylceramide (α -GalCer) présenté exclusivement par CD1d. En effet, les NKT sont capables par l'intermédiaire de leur TCR, de reconnaître les glycolipides présentés par le CD1d (ou CD1.1 chez la souris) des cellules présentatrices d'antigènes. Elles peuvent ensuite produire des cytokines de type Th1 ou Th2 dont une quantité significative d'IL-4 et d'IFN- γ selon l'environnement inflammatoire (Iwamura and Nakayama 2010). Afin de déterminer si les cellules NKT pouvaient induire l'asthme allergique expérimental, une équipe a provoqué l'asthme avec l'allergène ovalbumine chez des souris déficientes pour les iNKT ($J\alpha 281$ KO et CD1d KO). Leurs études ont démontrés un défaut dans le développement de l'hyperréactivité bronchique et de l'inflammation chez ces souris, prouvant ainsi que les iNKT peuvent être impliqués dans l'induction de l'asthme allergique (Akbari, Stock et al. 2003). Les iNKT sécrètent des cytokines ayant un effet direct sur les cellules hématopoïétiques, les cellules musculaires lisses des voies respiratoires et les cellules en gobelet. Elles régulent également d'autres types cellulaires impliquées dans la pathogenèse

de l'asthme comme les éosinophiles, les neutrophiles et les macrophages alvéolaires par exemple (**Figure 26**) (Matangkasombut, Pichavant et al. 2009).

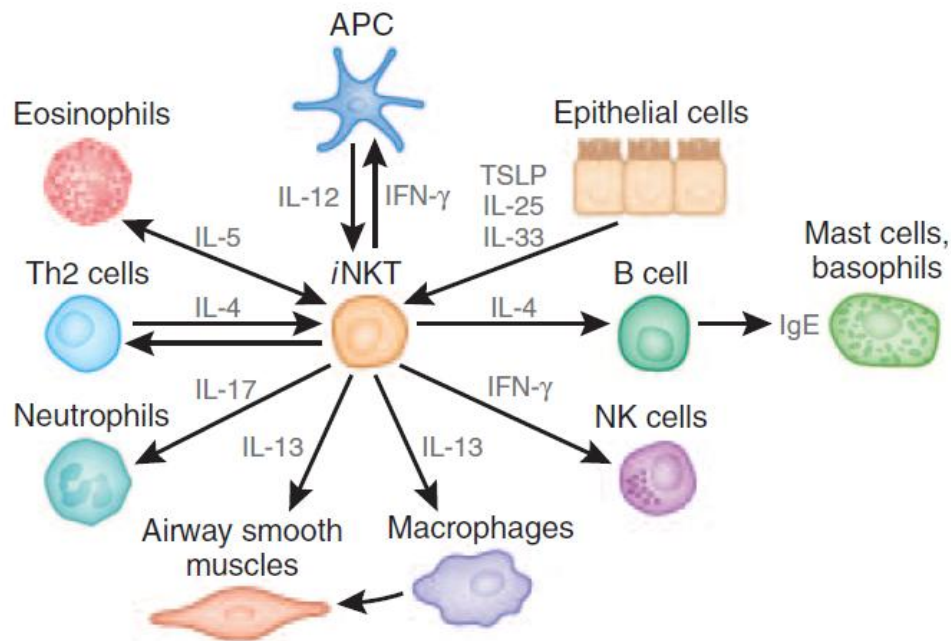


Figure 26: Fonctions des iNKT dans l'hyperréactivité bronchique (Matangkasombut, Pichavant et al. 2009).

5.5) Les éosinophiles

Les éosinophiles sont des acteurs majeurs dans la réponse inflammatoire de l'asthme allergique. Ces cellules sont retrouvées non seulement dans les parois bronchiques mais également en large nombre dans le lavage broncho-alvéolaire et dans les expectorations des sujets asthmatiques. Les précurseurs des éosinophiles sont des cellules CD34⁺ dont la majeure partie est recrutée dans la moelle osseuse suivant la libération de prostaglandine D₂, de cystéinyl-leucotriènes (peptido-lipides dérivés de l'acide arachidonique provenant des membranes cellulaires possédant des propriétés pharmacologiques aptes à mimer certaines caractéristiques propres aux désordres physiopathologiques des sujets asthmatiques), de cytokines et de chimiokines dans les voies aériennes asthmatiques (Holgate 2008) (**Figure 27**). Le développement des éosinophiles passent ensuite par la circulation via des compartiments micro vasculaires dans les parois des voies aériennes. Après activation par l'IL-5 produite par les cellules Th2 et les ILC2, les éosinophiles circulant sont recrutés au site inflammatoire grâce à des cytokines telles que l'IL-3, le GM-CSF et des chimiokines attirant les éosinophiles appelées éotaxines (CCL11 ou éotaxine 1, CCL24 ou éotaxine 2, CCL26 ou éotaxine 3) ainsi que des facteurs chimiotactiques générés par les macrophages

(macrophage chemotactic factor (MCP)-3, MCP-4 et RANTES (CCL5)) (Felton, Lucas et al. 2014).

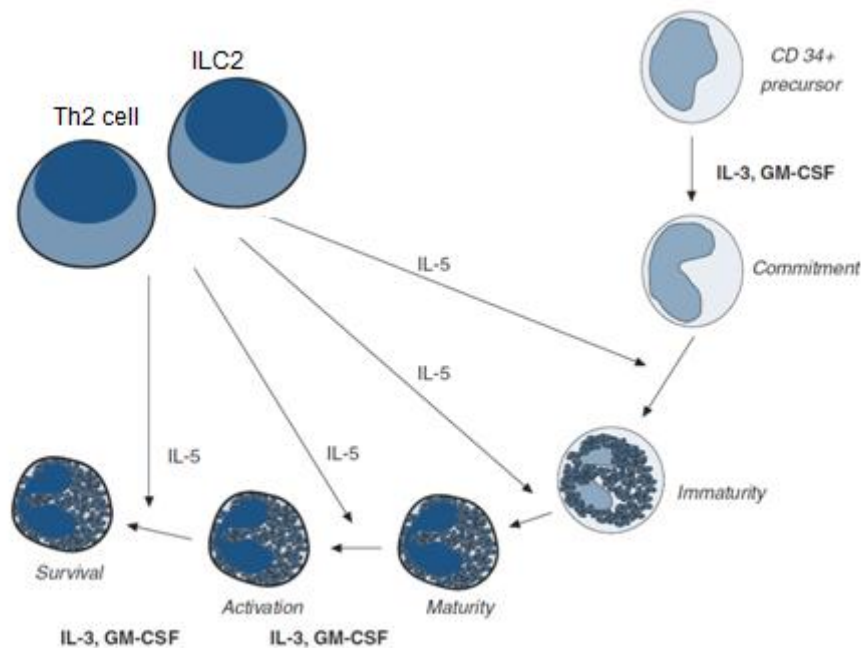


Figure 27: Cytokines Th2 impliquées dans la maturation et le recrutement des éosinophiles depuis leur précurseurs, les cellules CD34+ dans la moelle osseuse et les parois bronchiques (Modifié d'après (Holgate 2008)).

Les éosinophiles sont une source riche de granules constitués de protéines basiques comme l'éosinophile peroxydase (EPO) et des protéines éosinophiles cationiques. Ils ont également la capacité de générer des eicosanoïdes comme la prostacycline (PGI₂) et des cystéinyl-leucotriènes et de libérer des superoxydes pouvant endommager les tissus ainsi que des cytokines de type Th1 (IFN- γ et IL-2) et Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et TNF- α) (Blanchard and Rothenberg 2009). Les éosinophiles expriment à leur surface des récepteurs Fc ϵ RI. Pendant la réponse allergique, lors d'une nouvelle exposition, l'allergène est reconnu par les IgE fixés sur ces récepteurs. Cette reconnaissance a pour conséquence la dégranulation des éosinophiles, libérant ainsi leur contenu intracellulaire cytotoxique comme des protéines éosinophiles basiques entraînant des dommages au niveau des cellules épithéliales pulmonaires ainsi qu'une augmentation de la production de mucus par les cellules en gobelet et une bronchoconstriction résultant de la production d'IL-13 (Holgate 2008) (Felton, Lucas et al. 2014).

Leurs rôles exacts dans le mécanisme de la réponse asthmatique restent cependant énigmatiques. Il a clairement été établi que les éosinophiles étaient recrutés dans les poumons par les cellules Th2 comme des cellules effectrices des dernières étapes de la réponse allergique. Dans les modèles d'asthme murin, des taux d'éosinophiles importants sont retrouvés dans le sang et dans la moelle osseuse des souris.

Le rôle des éosinophiles dans la réaction d'hyperréactivité bronchique a longtemps fait l'objet de débat au sein de la communauté scientifique. En effet, des données contradictoires ont été obtenues sur des souris déficientes pour l'IL-5 ou pour son récepteur l'IL-5R (Deckers, Branco Madeira et al. 2013), l'IL-5 étant une cytokine qui permet l'activation des éosinophiles. Certains articles affirmaient que les souris déficientes pour l'IL-5 ne développaient pas d'hyperréactivité bronchique en réponse aux allergènes, tandis que d'autres articles démontraient que ces souris présentaient la même réponse que des souris sauvages. Ces désaccords venaient du fait que les souris utilisées ne possédaient pas le même fond génétique (Balb/c versus C57Bl/6). De plus, une étude a montré que l'administration d'anticorps neutralisant dirigés contre l'IL-5 permettait de réduire de façon important le nombre d'éosinophiles dans le sang et dans les sécrétions bronchiques sans avoir d'incidence sur l'hyperréactivité bronchique (Leckie 2003) (Kips, O'Connor et al. 2003).

Des études ont été menées afin de démontrer l'importance des éosinophiles dans l'asthme allergique induit par l'allergène d'acarien HDM (house dust mite). Une équipe a utilisé des souris Δ dblGATA déficientes pour les éosinophiles de fond génétique Balb/c. Le traitement des animaux par HDM révèle une augmentation significative de l'inflammation pulmonaire et de l'hyperréactivité bronchique. Cependant, le remodelage pulmonaire des souris Δ dblGATA reste inchangé comparé aux souris sauvages traitées avec HDM. Selon cette équipe, les éosinophiles joueraient un rôle négligeable dans l'asthme allergique induit par HDM et dans le remodelage bronchique (Fattouh, Al-Garawi et al. 2011). D'autres études menées avant celle-ci avaient démontré l'importance des éosinophiles dans le remodelage bronchique (Deckers, Branco Madeira et al. 2013). Le rôle de ces cellules est donc encore controversé à ce jour.

5.6) Les ILC (innate lymphoid cell)

Récemment, une voie alternative induisant une réponse de type 2 a été découverte. Une première observation a été faite sur une population de cellules qui distinctes des cellules B et T chez des souris $Rag2^{-/-}$ (Souris déficientes pour Rag, Recombinant activating gene) ayant la capacité de produire de l'IL-5 et de l'IL-13 mais pas d'IL-4. L'équipe Fort et al a effectué des injections intra-péritonéale d'IL-25 à des souris, ayant pour conséquence l'induction d'une réponse type Th2 caractérisée par une augmentation de la production d'IgE, d'IgG1 et d'IgA dans le sérum, une éosinophilie dans le sang et des modifications pathologiques au niveau des poumons et du tractus digestif. Ils ont mis en évidence une population cellulaire marquée positivement pour l'IL-5 intracellulaire chez les souris $Rag2^{-/-}$ (Fort, Cheung et al. 2001).

Récemment, en 2010, les chercheurs ont découvert que ces cellules produisaient un taux important de cytokine de type 2. De plus, l'administration d'IL-33 aux souris *Rag2*^{-/-} induit très efficacement l'hyperréactivité bronchique, l'hyperplasie des cellules caliciformes et l'infiltration d'éosinophile dans les poumons via l'IL-4, IL-5 et l'IL-13 (Li and Hendriks 2013).

En 2010, quatre équipes indépendantes ont décrit en détail un type cellulaire ni B, ni T produisant des cytokines Th2.

- Moro *et al* ont caractérisé une population de lignage négatif qui exprime les marqueurs Sca-1, CD117 (c-kit), CD25 (IL-2R α), CD127 (IL-17R α) et T1/ST2 (IL-33R) (Moro, Yamada *et al.* 2010).
- Neill *et al* ont découvert des nuocytes dans les ganglions lymphatiques mésentériques qui développent *in vivo* une réponse à l'IL-25 et à l'IL-33 et sont une source d'IL-33 (Neill, Wong *et al.* 2010).
- Price *et al* décrivent des cellules similaires dans la rate et le foie et les nomment « innate helper type 2 cells ». Ces cellules font partie de l'immunité innée et aident les lymphocytes T auxiliaires (Price, Liang *et al.* 2010).
- Saenz *et al* montrent que l'IL-25 permet l'accumulation d'une population de cellules progénitrices multipotentes Sca-1⁺CD117^{int} ayant la capacité de différencier les monocytes/macrophages et les granulocytes (Saenz, Siracusa *et al.* 2010)

Les cellules lymphoïdes innées (ILC, innate lymphoid cells) sont des cellules effectrices importantes de l'immunité innée particulièrement au niveau de l'épithélium, jouant un rôle central dans le remodelage des tissus. Des chercheurs ont émis l'hypothèse que toutes les ILC se développent à partir d'un précurseur commun qui dépend de l'expression du répresseur transcriptionnel ID2⁺ (inhibitor of DNA binding 2).

Les ILC sont divisées en trois classes selon des critères fonctionnels (Spits, Artis *et al.* 2013) (Figure 28) :

- Le groupe 1 est constitué des cellules NK classiques et des ILC1. Ces cellules ont besoin d'IL-15 pour se développer et sont définies par leur capacité à tuer les cellules cibles infectées en produisant de l'IFN γ par l'intermédiaire de l'IL-12 et de l'IL-18. Elles expriment les facteurs de transcription T-bet (ou *Tbx21*, caractéristique des cellules Th1) ou EOMES (Eomesodermin).
- Le groupe 2 est composé des cellules ILC2. Elles expriment les facteurs de transcription GATA3 (caractéristique des cellules Th2) et ROR α (caractéristique des cellules Th17) et produisent l'IL-5 et l'IL-13 par l'intermédiaire de l'IL-25, l'IL-33 et TSLP. Les ILC2 humaines sont également capables de produire l'IL-4 que les ILC2 murines ne peuvent pas produire *in vivo*. Les ILC2 sont davantage

spécialisées dans l'élimination des parasites extracellulaires. Elles participent également à la polarisation des macrophages vers le type M2.

- Le groupe 3 est constitué des cellules LT_i (Lymphoid tissue-inducer) et des ILC3 NCR⁻ ou NCR⁺ (natural cytotoxicity triggering receptor). Elles expriment le facteur de transcription caractéristique des cellules Th17, ROR γ t (RA receptor-related orphan receptor γ t), AhR (récepteur aux hydrocarbures aromatiques) ou T-bet (caractéristique des cellules Th1). Elles nécessitent l'IL-7 pour se développer et produisent les cytokines IL-17, IL-22 et l'IFN- γ par l'intermédiaire de l'IL-23 et de l'IL-1 β . Elles participent notamment à l'élimination des bactéries.

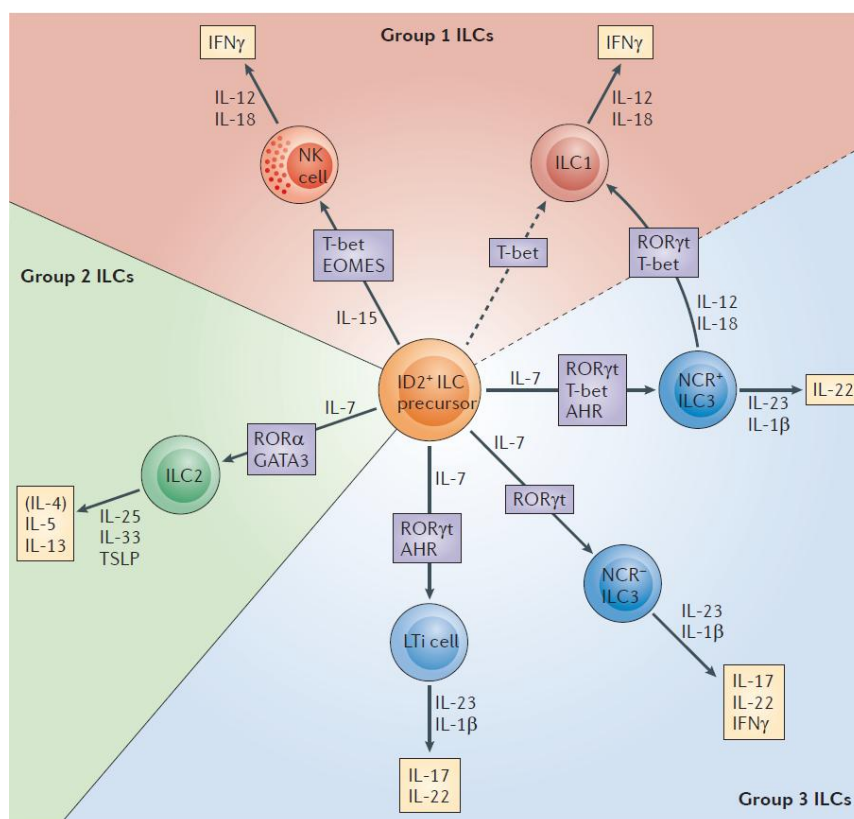


Figure 28: Classification des ILC en trois groupes selon leurs caractéristiques fonctionnelles (Spits, Artis et al. 2013).

Il a été montré que les ILC2 orchestrent l'éosinophilie et l'hyperplasie des cellules caliciformes à la surface des muqueuses, ces deux événements étant critiques dans les réactions contre les helminthes et dans les pathologies allergiques. Ainsi, les ILC2 sont également localisées dans les poumons et jouent un rôle dans la pathophysiologie de l'asthme et dans les réactions inflammatoires allergiques (Scanlon and McKenzie 2012).

Il a été rapporté que les patients atteints de rhinites présentaient une augmentation de l'expression d'IL-33 et de ST2 (le récepteur de l'IL-33) dans le sérum et dans les tissus. De

plus, les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses représentent deux sources majeures d'IL-33 chez les patients asthmatiques. Les gènes *IL-33* et *ST2* ont également été identifiés comme des gènes de susceptibilité à l'asthme lors de l'étude GWAS. La **figure 29** montre que l'IL-25 et l'IL-33 sont deux cytokines permettant la régulation et l'expansion des ILC2 chez la souris, suggérant ainsi que les ILC2 doivent être présentes dans les poumons des patients asthmatiques (Chang, DeKruyff et al. 2013).

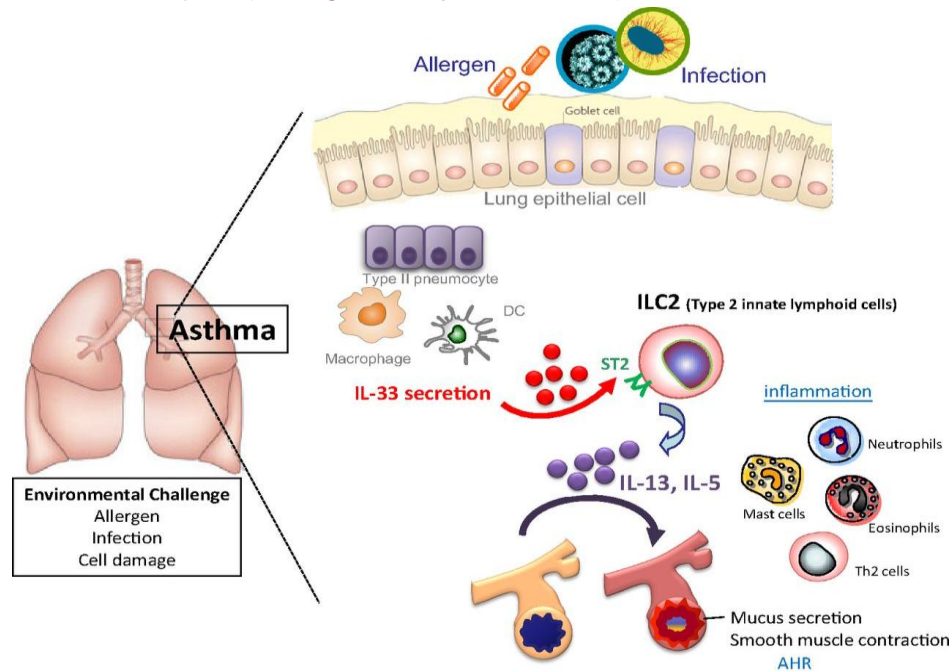


Figure 29: Voie de signalisation de l'asthme dépendant de l'axe IL-33/ST2 et des ILC2. L'IL-33 est produite par les cellules épithéliales, les pneumocytes de type II, les macrophages et les cellules dendritiques après exposition aux allergènes ou à une infection. L'IL-33 se fixe sur son récepteur ST2 exprimé par les cellules lymphoïdes innées ILC2 qui produisent l'IL-5 et l'IL-13 responsables de la sécrétion de mucus et de la contraction des muscles lisses (Chang, DeKruyff et al. 2013).

Lors d'un contact avec un allergène ou lors d'une infection, les cellules épithéliales pulmonaires sont endommagées. Les pneumocytes, les macrophages et les cellules dendritiques sécrètent alors de l'IL-33, libérée lors d'un signal de danger comme une alarmine. L'IL-33 se fixe alors sur son récepteur ST2 exprimé entre autre par les ILC2. Cette interaction conduit à la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13, deux cytokines qui induisent l'infiltration de cellules inflammatoires (neutrophiles, mastocytes, éosinophiles, cellules Th2), la sécrétion de mucus par les cellules épithéliales, la diminution du diamètre des bronches et le développement de l'hyperréactivité bronchique induisant ainsi l'asthme (Chang, DeKruyff et al. 2013). (Figure 29)

VI) LES MEDiateurs CYTOKINIQUES DE L'ASTHME ALLERGIQUE

Le développement de la réponse immunitaire nécessite la coopération efficace de plusieurs types cellulaires : les cellules lymphoïdes, les cellules de l'inflammation et les cellules hématopoïétiques. Ces interactions complexes sont médiées par un groupe de protéines appelées cytokines. Ce terme venant du grec *cyto*, cellule et *kinos*, mouvement, permet de mettre l'accent sur leur rôle dans la communication de cellule à cellule. Beaucoup de cytokines sont nommées interleukines (IL-) car elles sont sécrétées par certains leucocytes et agissent sur d'autres leucocytes. A ce jour, 38 interleukines ont été découvertes chez l'homme. Cependant, dans ce chapitre seulement quelques unes seront décrites plus en détail en fonction de leur rôle dans l'asthme allergique :

- Dans un premier temps l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, des cytokines largement explorées dans la littérature scientifique et considérées comme des pivots de la régulation du phénotype allergique.
- Dans un second temps l'IL-25, l'IL-33 et TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), des cytokines sécrétées par les cellules épithéliales agissent en synergie.
- Dans un troisième temps, l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-18, des cytokines pro-inflammatoires de la famille de l'IL-1.
- Et enfin, les chimiokines, des cytokines qui attirent des cellules par chimiotactisme.

6.1) IL-4, IL-5 et IL-13

L'IL-4 et l'IL-13 sont principalement produites par les cellules activées CD4⁺ Th2, les mastocytes, les éosinophiles et les basophiles (Motomura, Morita et al. 2014). Les macrophages alvéolaires activés peuvent aussi libérer des quantités substantielles d'IL-4. De plus, les cellules T CD8⁺ et les iNKT produisent cette cytokine dans les modèles oncologiques murins et les pathologies respiratoires tandis que les cellules NK peuvent produire l'IL-13 en réponse à l'IL-2 (Williams, Rahman et al. 2012). L'IL-4 et l'IL-13 sont aussi produites par les ILC2 (Chaput, Sander et al. 2013).

L'IL-4 se fixe sur deux récepteurs, l'un étant commun à l'IL-13, il s'agit de l'IL-4R α / γ c (chaîne γ) et de l'IL-4R α /IL-13R1 (Firestein, Budd et al. 2012). L'IL-13 peut aussi se lier au récepteur IL-13R α 2c. Une cascade de transduction de signal est induite après fixation de l'IL-4 et de l'IL-13 à leurs récepteurs respectifs (Figure 30). Cette cascade implique l'activation de JAK3 (Janus Kinase), JAK2 et TYK 2 (TYrosine Kinase 2) qui à leur tour phosphorylent STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription-factor 6). Après

dimérisation, STAT6 migre vers le noyau où il se lie au promoteur des gènes induit par l'IL-4 et l'IL-13. Ainsi, il s'agit d'un facteur de transcription critique pour la différenciation des cellules T naïves en cellules Th2 et la régulation de la production de chimiokines Th2 induites par l'IL-4 et l'IL-13, incluant l'éotaxine (chimiokine attirant les éosinophiles) par les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (Oh, Geba et al. 2010).

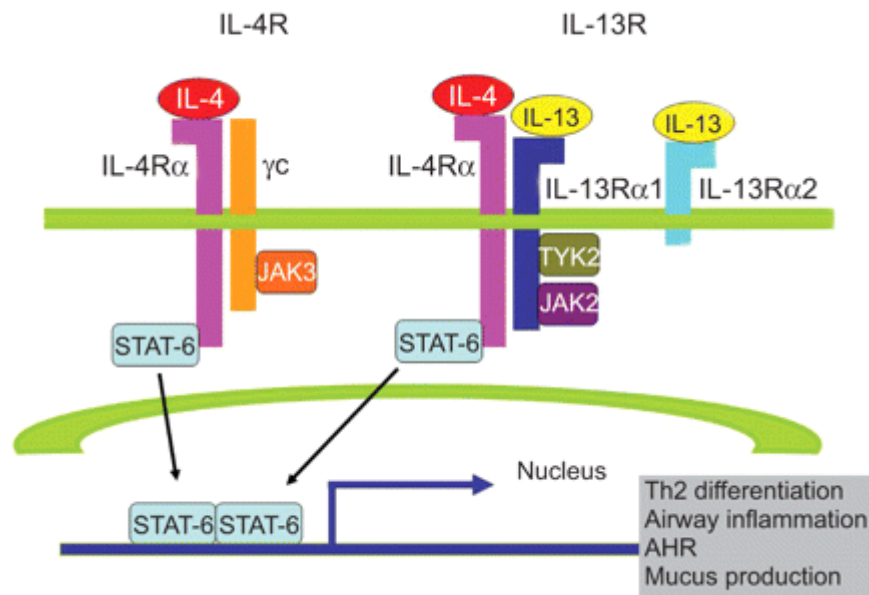


Figure 30: Schéma représentant les différents récepteurs de l'IL-4 et l'IL-13 ainsi que la cascade de transduction de signal conduisant aux caractéristiques de l'asthme allergique (Oh, Geba et al. 2010).

L'IL-4 et l'IL-13 sont des cytokines majeures induisant la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2, capables d'inhiber la différenciation vers la voie Th1 ou Th17. L'IL-4 favorise également la production des IgG1 et des IgE (Figure 31) (Wenzel 2012). Ainsi, l'IL-4 et l'IL-13 sont des pivots dans la régulation du phénotype allergique. Les mastocytes, les ILC2 et les cellules Th2 activées sécrètent non seulement de l'IL-4 et de l'IL-13 mais également de l'IL-5 (Figure 31) (Chaput, Sander et al. 2013) (Wenzel 2012).

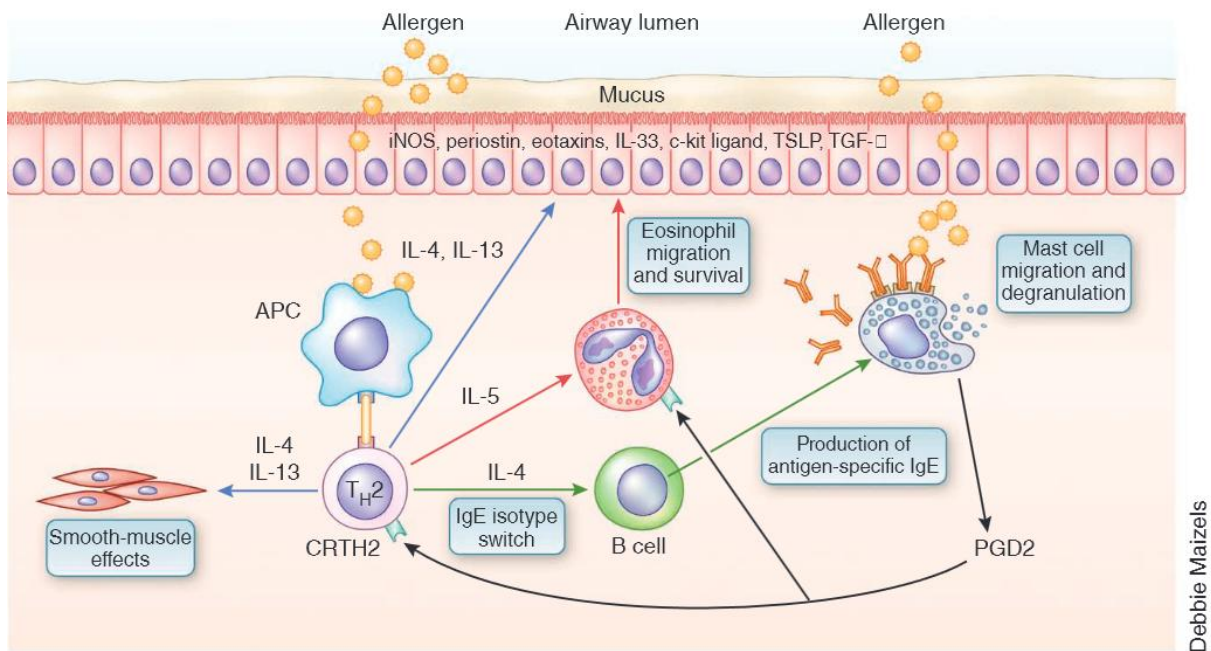
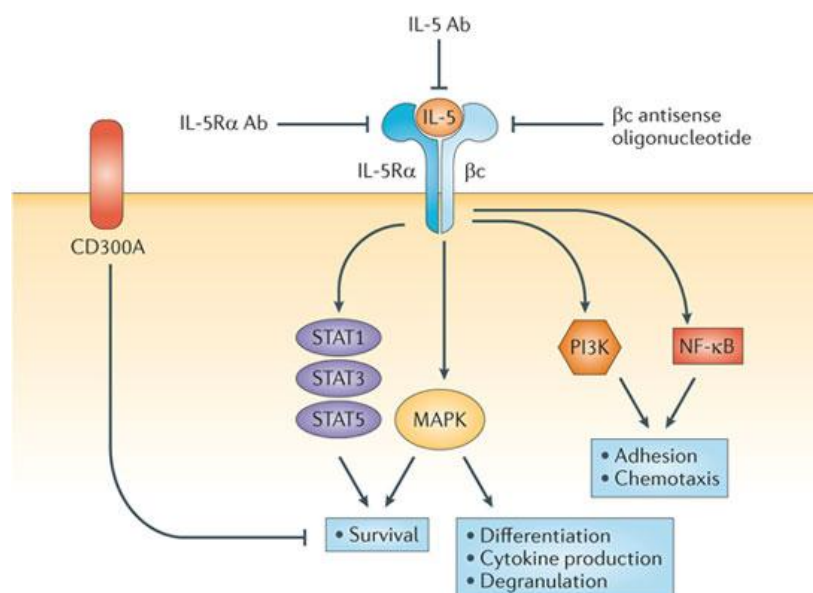


Figure 31 : Réponse immune Th2 dans les voies respiratoires des patients asthmatiques (Wenzel 2012).

La fixation de l'IL-5 sur ces récepteurs l'IL-5R α et l'IL-5R β c a pour conséquence l'activation de STAT1, STAT3, STAT5, MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et NF- κ B. L'IL-5 régule le phénotype allergique puisque la cascade de signalisation qu'elle déclenche permet la différenciation et l'activation des éosinophiles, la différenciation des cellules B et la production de cytokines et d'IgA (**Figure 32**) (Firestein, Budd et al. 2012) (Fulkerson and Rothenberg 2013).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 32 : Schéma représentant la cascade de signalisation impliquant le récepteur de l'IL-5. La fixation de l'IL-5 sur ces récepteurs l'IL-5R α et l'IL-5R β c entraîne l'activation de voies de signalisation conduisant au phénotype asthmatique (Fulkerson and Rothenberg 2013).

6.2) IL-25, l'IL-33 et TSLP

L'IL-25, l'IL-33 et TSLP sont trois cytokines souvent associées. Très similaires, elles appartiennent pourtant à des familles différentes. Controversées, elles sont considérées comme des régulateurs clés de l'asthme allergique et sont sécrétées en majorité par les cellules épithéliales. Ces cytokines agissent en synergie et chacune à sa manière participe à l'induction de la réponse Th2 et est responsable entre autre de l'expansion des ILC2 dans les poumons.

6.2.1) L'interleukine-25

Découverte en 2001 et aussi connue sous le nom d'IL-17E, l'IL-25 est un membre de la famille de l'IL-17 qui est impliqué dans les réponses immunes Th2. L'IL-25 se fixe sur son récepteur constitué des sous-unités IL17RB et IL25R et exprimés majoritairement par les cellules Th2 (Jacquet 2013).

L'IL-25 n'est pas seulement produite par les cellules épithéliales mais aussi par les cellules Th2, les mastocytes, les macrophages, les éosinophiles et les basophiles (Bartemes and Kita 2012). L'enzyme protéolytique MMP7 des cellules épithéliales bronchiques est nécessaire pour une production optimale d'IL-25 (Schuijs, Willart et al. 2013).

Les membres de la famille Th17 sont connus pour leur capacité à induire une inflammation neutrophilique. Or, ce n'est pas le cas de l'IL-25. En effet, la surexpression de l'IL-25 dans les cellules épithéliales pulmonaires conduit à la production de mucus et à l'infiltration d'éosinophiles et de macrophages dans les voies respiratoires (Jacquet 2013) (Bartemes and Kita 2012). L'IL-25 aide aussi à la prolifération et à la polarisation des lymphocytes Th2 mémoires et stimule leur production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 (Fort, Cheung et al. 2001). Administré dans les voies respiratoires, l'IL-25 agit directement sur les pre-ILC2 pour induire leur expansion et leur activation (Barlow, Bellosi et al. 2012) (Licona-Limon, Kim et al. 2013) (Figure 38). Ainsi, l'IL-25 est surexprimée dans les voies aériennes des sujets asthmatiques.

6.2.2) L'interleukine-33

L'IL-33, aussi connue sous le nom d'IL-1F11, fut identifiée à l'origine comme le facteur nucléaire NF-HEV (Nuclear Factor from High Endothelial Venules) et comme DVS27, un gène surexprimé dans les cas de vasospasmes cérébraux canins (Miller 2011). Cependant, c'est en 2005, lors d'une étude de (Schmitz, Owyang et al. 2005), que l'IL-33 fut

mise en évidence. En effet, une analyse structurale de l'IL-33 a révélé que cette protéine possède des homologies de séquence avec l'IL-18 et la structure caractéristique des membres de la famille de l'IL-1 en feuillet β .

L'IL-33 est exprimée de manière prédominante dans les cellules stromales comme les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. La nécrose liée aux dommages causés à ces cellules permet la libération de la forme entière de l'IL-33 qui se fixe sur ces récepteurs (Miller 2011) (Figure 33).

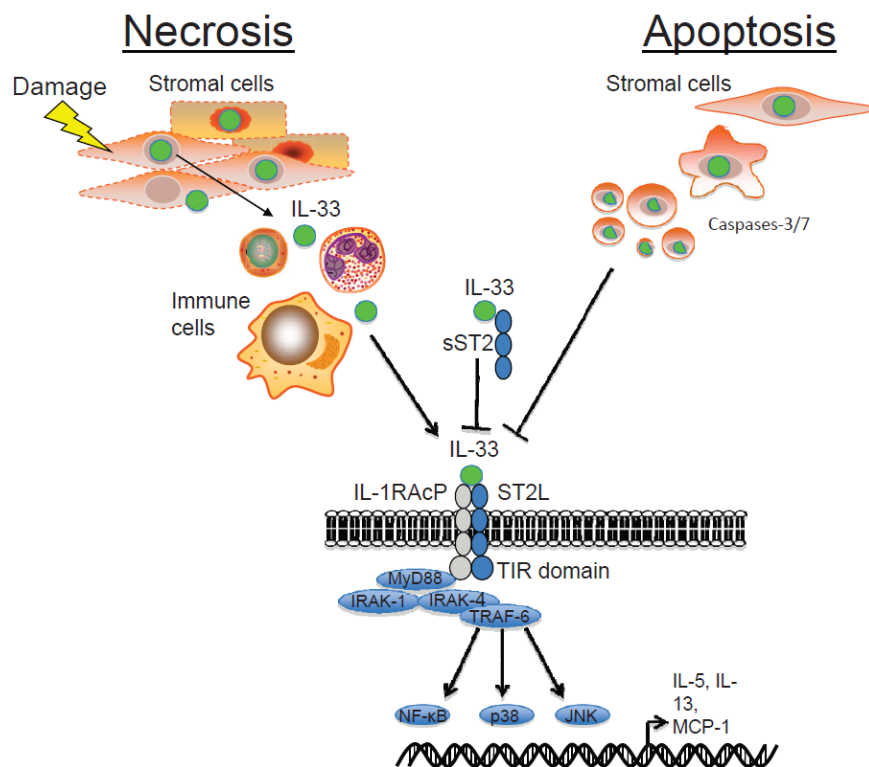


Figure 33 : Libération de l'IL-33, fixation sur son récepteur ST2 et voies de signalisation induites. Libération de l'IL-33 par les cellules stromales nécrosées, fixation sur ses récepteurs sST2 (inhibe IL-33) et ST2L. La liaison IL-33/ST2L induit le recrutement d'IL-1RAcP et la voie de signalisation de ce co-récepteur menant à la production de cytokines. Durant l'apoptose, le clivage de l'IL-33 par les caspase-3 et 7 conduit à son inactivation (Miller 2011).

L'IL-33 est le ligand du récepteur ST2 (appelé aussi T1, IL-1RL1, DER4 ou IL-33 α), un membre de la superfamille des récepteurs toll-like (TLR)/IL1R (Schmitz, Owyang et al. 2005). Deux variants du gène IL-33 α sont produits par épissage alternatif : la forme transmembranaire ST2L et la forme soluble sST2. Cette dernière forme soluble est nommée récepteur « decoy ». C'est en quelque sorte un appeau qui attire et piège l'IL-33, bloquant ainsi la voie de signalisation IL-33/ST2 (Hayakawa, Hayakawa et al. 2007). La fixation de l'IL-33 sur le récepteur transmembranaire ST2L forme un complexe qui recrute la chaîne IL-1RAcP (IL-1R accessory protein) en tant que co-récepteur. Cet événement conduit au recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 et à l'activation de facteurs de transcription

tels que NF- κ B via TRAF6, IRAK-1/4 et les MAP kinases ainsi qu'à la production de cytokines Th2 comme IL-5, et IL-13. La signalisation est possible grâce au domaine TIR (Toll-Interleukin-1 Receptor) de la chaîne IL-1RAcP (Ali, Huber et al. 2007) (**Figure 33**). De plus, des études ont montrés que la signalisation IL-33/ST2L pouvait être régulée négativement par un autre récepteur de la famille de l'IL-1R1 nommé SIGIRR (single Ig IL-1R-related molecule) aussi appelée TIR8 (Toll IL-1R8). Les réponses immunes induites par l'IL-33 seraient renforcées chez les souris déficientes pour SIGIRR (Bulek, Swaidani et al. 2009).

Le récepteur ST2 est exprimé à la surface d'un grand nombre de cellules de l'immunité : les lymphocytes Th2, les basophiles, les cellules NKT et iNKT, les mastocytes, les éosinophiles, les cellules NK, les cellules dendritiques et les macrophages (Ohno, Morita et al. 2012). Des études récentes ont démontré l'existence du récepteur ST2 sur les ILC2, cellules de l'immunité innée (Chang, DeKruyff et al. 2013) (**Figure 29**). Cette interaction conduit à la sécrétion d'IL-6 pro-inflammatoire, d'IL-5 et d'IL-13 et donc aux caractéristiques de l'asthme (infiltration cellulaire, sécrétion de mucus par les cellules épithéliales, diminution du diamètre des bronches et développement de l'hyperréactivité bronchique).

L'IL-33 est une cytokine produite sous la forme d'un précurseur de 270 résidus (**Figure 34**) possédant une double fonction. En effet, elle peut agir en tant que cytokine décisive dans la réponse immune innée de type 2 comme l'IL-25, durant les infections et les pathologies inflammatoires et allergiques, en se fixant sur son récepteur ST2 via le domaine C-terminal (IL-1 like domain). Elle joue aussi un rôle de facteur nucléaire intracellulaire pouvant se lier à l'hétérochromatine et possédant des propriétés de répresseur transcriptionnel via son domaine N-terminal (Smith 2010). Cependant aucun gène cible régulé par l'IL-33 intracellulaire n'a été identifié.

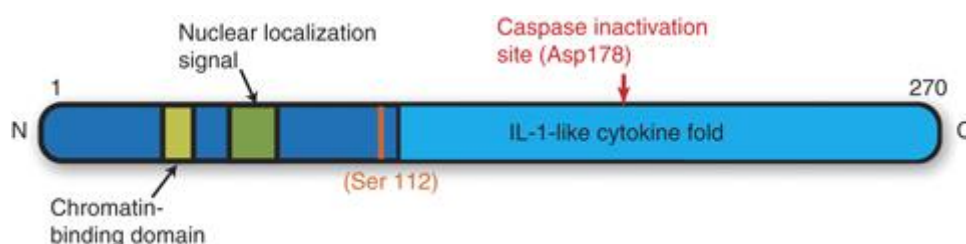


Figure 34 : Représentation schématique de la structure de l'IL-33 (Smith 2010).

De plus au même titre que l'IL-1 α et HMGB1, l'IL-33 est considérée comme un signal de danger endogène ou une alarmine par sa localisation nucléaire et sa sécrétion par les cellules nécrosées (Lefrançois and Cayrol 2012). Contrairement à l'IL-1 β et à l'IL-18, la forme entière de l'IL-33 (full-length) est biologiquement active. Le clivage de l'IL-33 a fait l'objet de nombreuses controverses ces dernières années. En effet, il a été démontré par Schmitz *et al.*, que l'IL-33 comme les autres membres de la famille de l'IL-1, c'est-à-dire l'IL-

1 β et l'IL-18, nécessitait d'être clivée par la caspase-1/11 pour avoir une activité biologique optimale. Les travaux de cette équipe indiquaient que le clivage de l'IL-33 par la caspase-1 après le résidu Ser₁₁₁, permettant la production d'une forme mature d'IL-33₁₁₂₋₂₇₀ (Schmitz, Owyang et al. 2005). Cependant, quatre ans plus tard, l'équipe de Jean-Philippe Girard démontre que le clivage de l'IL-33 par la caspase-1 ne se faisait pas au site de clivage décrit par Schmitz *et al.*, mais après le résidu Asp₁₇₈ dans le domaine C-terminal et que ce clivage inactive l'IL-33 (Cayrol and Girard 2009). L'IL-33 peut également être clivée par d'autres enzymes comme la cathepsine G et l'élastase par exemple (Figure 35) (Lefrançois and Cayrol 2012).

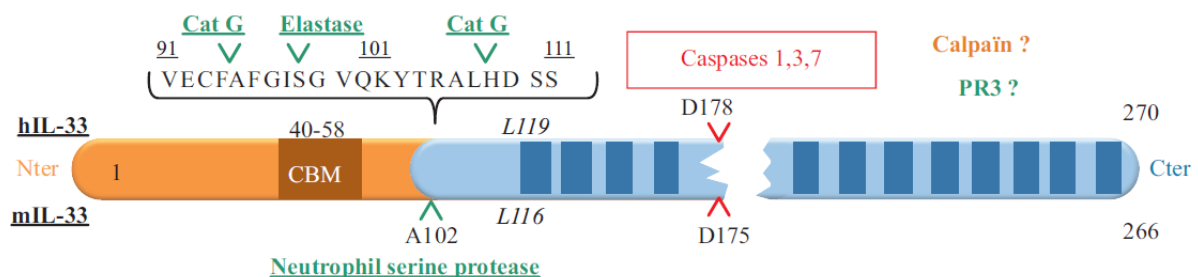


Figure 35 : Représentation schématique de la structure de l'IL-33 et de ces sites de clivages. L'IL-33 peut être clivée par la cathepsine G, l'élastase et par les caspases-1, 3 et 7 (Lefrançois and Cayrol 2012).

La figure 36 résume les données précédentes à savoir que l'IL-33 est constitutivement exprimée dans le noyau des cellules endothéliales et épithéliales, à l'abri, protégée du clivage. Lors de la mort cellulaire programmée (apoptose), l'IL-33 libérée est clivée et inactivée par les caspases tandis que pendant la nécrose, la forme entière et active de l'IL-33 (full length) est libérée. Lors d'un stress ou d'un dommage cellulaire, les neutrophiles sont recrutés au site d'infection. Ils sécrètent des sérines protéases (élastase, cathepsine G, protéinase 3) capables de cliver et d'amplifier la bioactivité de l'IL-33 (Lefrançois, Roga et al. 2012). L'IL-33 se fixe sur son récepteur ST2 exprimé par les ILC2, les mastocytes, les granulocytes et les lymphocytes Th2 qui produisent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-5, IL-13) induisant une réponse inflammatoire de type 2 (Licona-Limon, Kim et al. 2013).

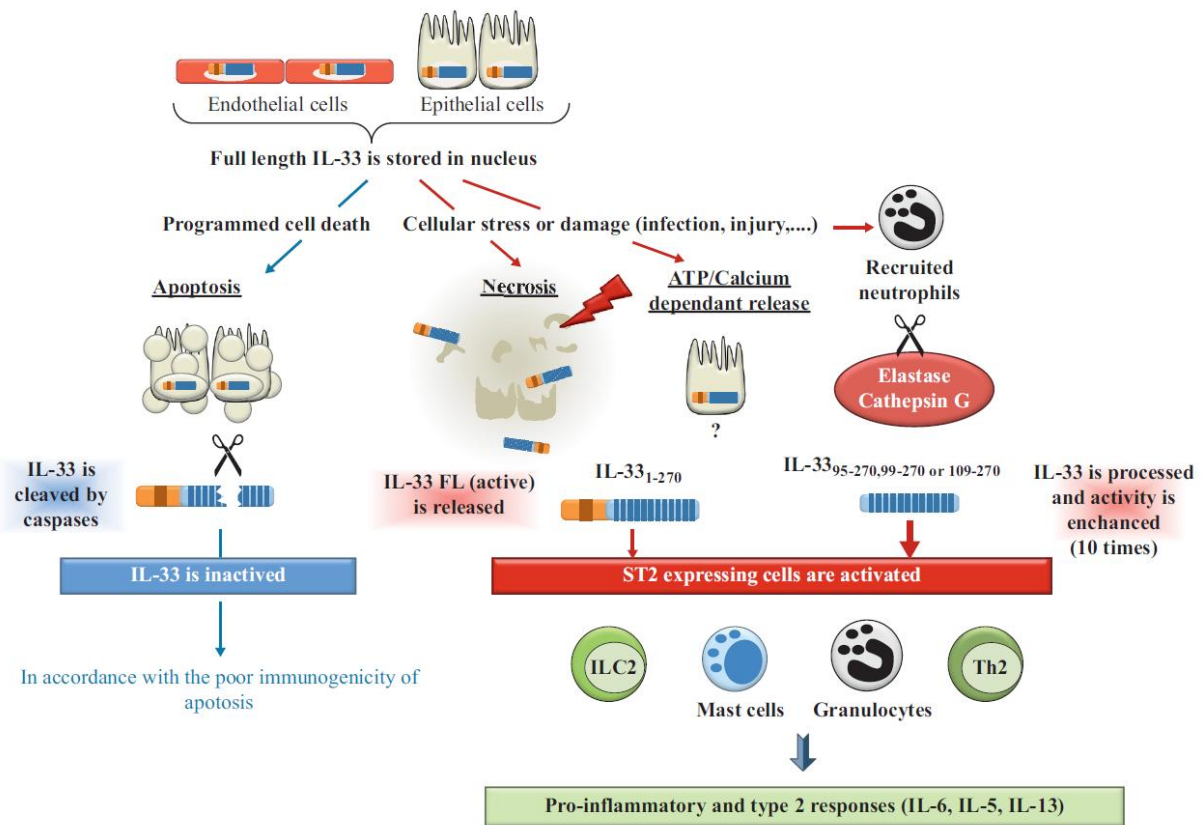


Figure 36 : Représentation schématique de la sécrétion d'IL-33 et des mécanismes permettant sa maturation. L'IL-33 est stockée dans le noyau des cellules épithéliales et des cellules endothéliales. Cette cytokine est libérée lors de l'apoptose puis clivée par la caspase-1 qui l'inactive. Lors d'un stress cellulaire la forme entière (FL, Full-Lenght) est libérée comme alarmine dans le milieu et active les cellules qui expriment son récepteur, ST2 (ILC2, mastocytes, granulocytes, lymphocytes Th2). Leur induction s'accompagne d'une réponse pro-inflammatoire de type 2 avec la production de cytokines (IL-6, IL-5, IL-13). Des neutrophiles peuvent être recrutés lors du stress cellulaire. Ils produisent des protéases (élastase, cathepsine G) capables de cliver l'IL-33. (Lefrançois and Cayrol 2012).

Mais l'IL-33 joue d'autres rôles dans des pathologies comme la dermatite atopique, la rhinite allergique mais aussi les maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde ainsi que des maladies cardiovasculaires, l'obésité et le cancer (Miller 2011).

Toutes ces cytokines induites par les voies de signalisation impliquant le complexe IL-33/ST2L jouent des rôles cruciaux dans l'asthme allergique (Figure 37).

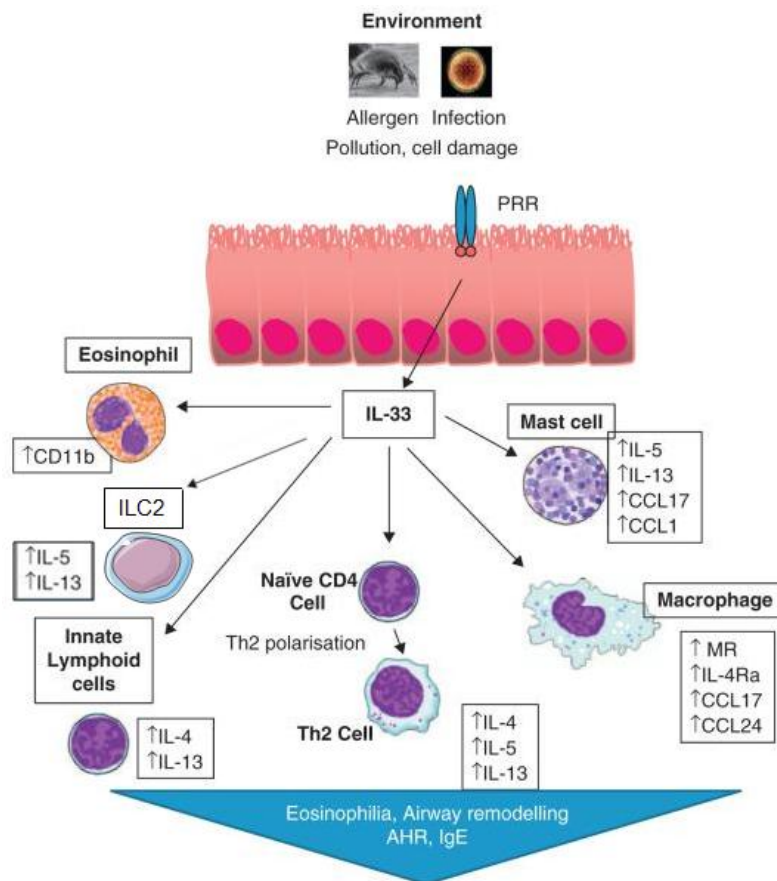


Figure 37 : Représentation schématique de l'implication de l'IL-33 dans l'asthme, des cellules sur lesquelles elle se fixe et des cytokines et chimiokines que ces cellules produisent après activation. L'IL-33 joue un rôle indirect dans l'éosinophilie, le remodelage bronchique, l'hyper-réactivité bronchique et la production d'IgE (Modifié d'après (Lloyd 2010)).

6.2.3) Le TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin)

TSLP est une cytokine structuellement proche de l'IL-7 produite par les cellules épithéliales, les fibroblastes, les mastocytes et les kératinocytes. Il se fixe sur un récepteur hétérodimérique composé d'une chaîne de fixation spécifique et d'une chaîne IL-7R α . Le TSLP a plusieurs actions mais ses principales cibles semblent être les cellules dendritiques par lesquelles il permet la différenciation des cellules Th2 qui produisent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Fulkerson and Rothenberg 2013).

Il a été démontré que le TSLP était surexprimé dans les biopsies de bronches de patients asthmatiques (Jacquet 2013). De plus, l'expression de TSLP est induite par des protéases qui interagissent avec PAR-2. Ainsi il contribue à l'inflammation allergique (Williams, Rahman et al. 2012). En effet, les souris déficientes pour TSLP montrent une réduction considérable des caractéristiques de l'asthme. Enfin, le gène codant pour TSLP

Family name	Name	Property
IL-1F1	IL-1a	Agonist
IL-1F2	IL-1b	Agonist
IL-1F3	IL-1 Ra	Receptor antagonist
IL-1F4	IL-18	Agonist
IL-1F5	IL-36Ra	Receptor antagonist
IL-1F6	IL-36a	Agonist
IL-1F7	IL-37	Pro-inflammatory cytokine
IL-1F8	IL-36b	Agonist
IL-1F9	IL-36g	Agonist
IL-1F10	IL-38	Receptor antagonist
IL-1F11	IL-33	Agonist

Tableau II : Tableau récapitulatif des membres de la famille de l'IL-1 avec les différentes nomenclatures ainsi que leur propriété (d'après (Dinarello 2009) et (Carta, Lavieri et al. 2013))

Les récepteurs des membres de la famille IL-1 sont les suivants : le récepteur IL-1 (IL-1R1 et IL-1RAcP), le récepteur IL-33 (ST2 et IL-1RAcP), le récepteur IL-18 (IL-18R α et IL-18R β) et le récepteur IL-36 (IL-1Rrp2 et IL-1RAcP). Deux membres de la famille sont des récepteurs « decoy » : l'IL-R2 et l'IL-18BP (Figure 39).

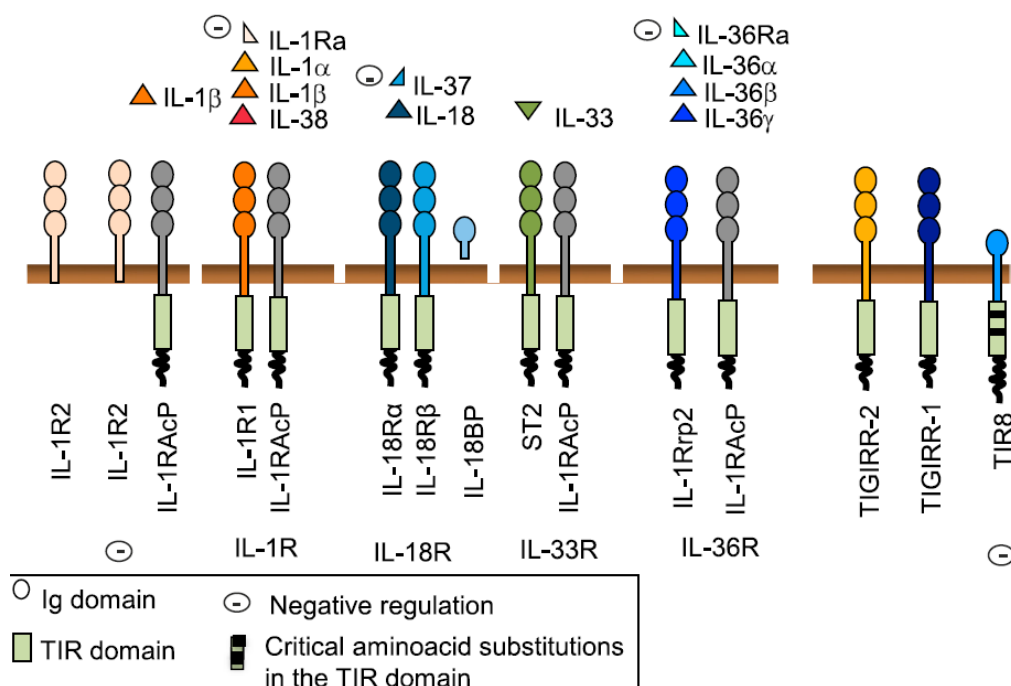


Figure 39 : Représentation schématique des ligands et récepteurs de la famille de l'IL-1. Le symbole « négatif » indique une inhibition et TIR8 est aussi nommé SIGIRR (voir partie 6.2.2) (Garlanda, Dinarello et al. 2013).

Les cytokines de la famille de l'IL-1 sont hautement régulées et leur dérégulation entraîne de graves conséquences pathologiques. Nous nous intéresserons dans cette partie à trois membres de la famille de l'IL-1, à savoir l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-18.

Les cellules produisant majoritairement l'IL-1 α sont les monocytes, les cellules B, les neutrophiles polymorphonucléaires, les cellules épithéliales et les kératinocytes. Constitutivement présent dans la barrière épithéliale (tractus gastro-intestinal, poumon, rate, foie, cellules endothéliales, astrocytes), le précurseur de l'IL-1 α , comme l'IL-33, est considéré comme une alarmine (Chen, Kono et al. 2007). En effet, libérée par les cellules nécrosées, l'IL-1 α constitue un signal de danger endogène qui initie rapidement des cascades de signalisation induisant la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (Cayrol and Girard 2009). L'IL-1 α peut cependant être clivée par des enzymes telles que l'élastase, le granzyme B, la chymase ou la calpaïne (Figure 40).

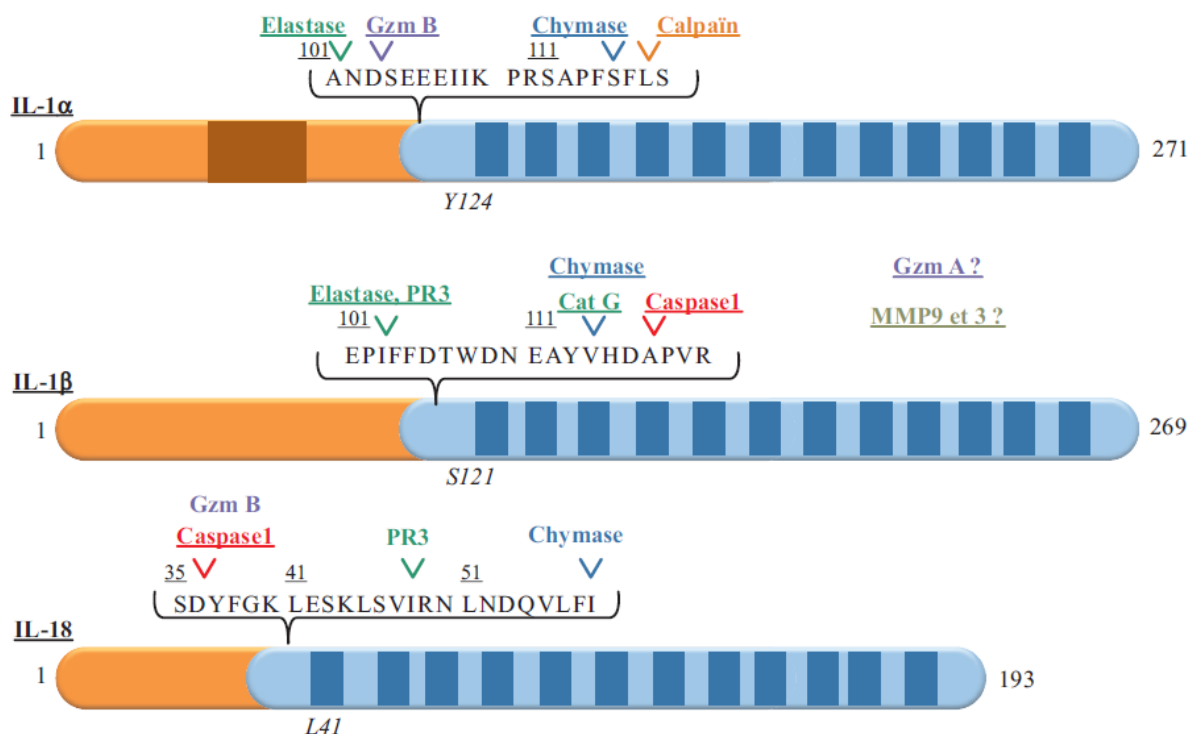


Figure 40 : Représentation schématique des structures de l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-18 et leurs sites de clivages. L'IL-1 α peut être clivée par l'élastase, le granzyme B, la chymase et la calpaïne. L'IL-1 β peut être clivée par l'élastase, la protéinase 3, la chymase, la cathepsine G, la caspase-1. L'IL-18 peut être clivée par le granzyme B, la caspase-1, la protéinase 3 et la chymase (Lefrançois and Cayrol 2012).

Ainsi, l'IL-1 α joue un rôle crucial dans les phases précoces de l'inflammation. Il a été démontré que l'IL-1 α contrôle la sensibilisation aux allergènes d'acarien HDM via la libération de GM-CSF et d'IL-33 par les cellules épithéliales (Willart, Deswarte et al. 2012). En effet, il existe une boucle autocrine endogène dans laquelle l'IL-1 α libéré par les cellules épithéliales

agit sur le récepteur IL-1RI présent sur les mêmes cellules, permettant ainsi la production de cytokines.

Contrairement à l'IL-1 α , l'IL-1 β est synthétisée sous une pro-forme qui doit être clivée par la caspase-1 pour être activée puis libérée dans l'espace extracellulaire (**Figure 41**). Cependant, la caspase-1 n'est pas la seule enzyme à pouvoir cliver l'IL-1 β . En effet, les enzymes libérées par les neutrophiles telles que la protéinase-3, la cathepsine G, l'élastase ou encore les chymases libérées par les mastocytes ou le granzyme B par les cellules cytotoxiques, génèrent une forme active de l'IL-1 β car leur site de clivage est proche de celui de la caspase-1 (**Figure 40**) (Garlanda, Dinarello et al. 2013) (Lefrançois and Cayrol 2012).

Après clivage, l'IL-1 β mature est sécrétée dans le milieu extracellulaire où elle stimule à la fois la réponse innée et la réponse adaptative en régulant l'expression de gène pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines). Cependant, l'implication de l'axe inflammasome/caspase-1/IL-1 β dans l'asthme allergique n'est pas très claire pour le moment. En effet, Hammad et al ont démontré que les souris déficientes pour NLRP3, ASC ou caspase-1, impliquées dans l'inflammasome, traitées avec HDM ne présentaient pas de réduction du développement de l'asthme (Kool, Willart et al. 2011).

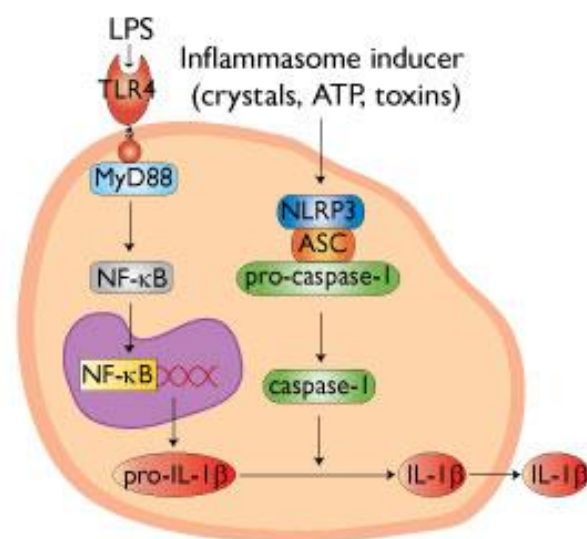


Figure 41 : Représentation schématique de l'activation de l'IL-1 β . Le Lipopolysaccharide des bactéries et de certains allergènes est reconnu par le TLR4, exprimé à la surface des cellules épithéliales. Ceci entraîne l'activation de la protéine adaptative MyD88 qui permet la production du facteur de transcription NF- κ B permettant la génération de la pro-forme de l'IL-1 β . D'un autre côté les signaux de danger auxquels sont exposées les cellules (cristaux d'acide urique, ATP, toxines) activent l'inflammasome NLRP3 qui active à son tour la caspase-1 qui clive la pro-IL-1 β en IL-1 β (Modifié d'après InvivoGen)

L'IL-1 β et l'IL-18 sont codées par des gènes distincts mais possèdent une structure tridimensionnelle relativement similaire en feuillet bêta (Kato, Jee et al. 2003). De plus, tout comme l'IL-1 β , l'IL-18 est synthétisée sous forme d'un précurseur qui doit être clivé par la caspase-1 ou d'autres enzymes pour être activée (**Figure 40**) (Garlanda, Dinarello et al. 2013).

L'IL-18 est exprimée constitutivement dans les macrophages, les DC, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Il s'agit d'une cytokine jouant un rôle dans la polarisation des lymphocytes Th1 mais elle participe également aux réponses Th2. En effet, en présence d'IL-12, l'IL-18 stimule la production d'IFN- γ par les cellules Th1 alors qu'en absence d'IL-12, elle favorise la production d'IL-4 et donc la polarisation Th2 (Kawayama, Okamoto et al. 2012) (Garlanda, Dinarello et al. 2013). Ainsi, en initiant la réponse Th2 et en induisant la production d'IgE, l'IL-18 joue un rôle dans la pathologie de l'asthme. De plus, il a été démontré que les patients asthmatiques ont un fort taux d'IL-18 exprimé dans le sérum par rapport à des patients sains (Wong, Ho et al. 2001). Des biopsies réalisées sur des échantillons de poumon de patients asthmatiques révèlent que l'IL-18 est fortement exprimée dans les cellules épithéliales des voies respiratoires et dans les cellules musculaires lisses (Kawayama, Okamoto et al. 2012). Ce qui nous montre bien l'importance de cette cytokine.

6.4) Les chimiokines

Il existe une classe particulière de cytokines capables de recruter des cellules spécifiques par chimiotactisme. Elles sont appelées chimiokines. Il s'agit d'une superfamille de petits polypeptides solubles de 8 à 10 kDa, qui contrôlent l'adhésion, le chimiotactisme et l'activation de nombreuses populations de leucocytes (Tulic, Fiset et al. 2005). Leur signalisation passe par des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR). Les chimiokines ont été divisées en sous-classe selon leur structure : CXC, CC, C et CX3C. Les deux groupes principaux étant CXC (chimiokine α) et CC (chimiokine β) (**Figure 42**). Les chimiokines du groupe CC sont les plus importantes dans la pathogenèse de l'asthme puisqu'elles ciblent les monocytes, les cellules T et les éosinophiles (Pease 2006). Celles qui ont pour cible les éosinophiles sont appelées eotaxin (CCL11), eotaxin-2 (CCL24) et eotaxin-3 (CCL26). Leur taux est couramment mesuré dans les modèles d'asthme allergique et reflètent le recrutement d'éosinophiles dans les poumons.

Les cytokines et les chimiokines régulent l'entrée des cellules inflammatoire au site d'inflammation en augmentant l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et inflammatoires. Les cellules roulent puis adhèrent sur les cellules endothéliales et finissent par migrer vers le site d'inflammation en suivant le gradient de chimiokine plus élevé à cet endroit : il s'agit de la chimiotaxie (Tulic, Fiset et al. 2005).

Chemokine	Colloquial Name †	Receptor Activity	Produced by:	Recruits:
CCL1	I-309	CCR8 [82, 83]	T-cells [147], monocytes [148]	Th2 lymphocytes [73], monocytes [149], NK cells [150], regulatory T-cells [96]
CCL11	Eotaxin	CCR3 [17-19], CCR2 [104, 105] CCR5 [104]	Epithelial cells [10, 151, 152] Smooth muscle cells [153] Endothelial cells [32, 154] macrophages [32, 154] Eosinophils [155] T-cells [32] Fibroblasts [156, 157]	Eosinophils [10], Th2 lymphocytes [21], b asophils [20], thymocytes [158] macrophages mast cells [159]
CCL13	MCP-4	CCR2 [160], CCR3 [122, 160]	epithelial cells [154, 160]	Monocytes [161, 162] Basophils [20] T-lymphocytes [162]
CCL17	TARC	CCR4 [61]	Thymus [163] monocytes [69] Dendritic cells [69] Epithelial cells [164]	Th2 lymphocytes [72, 165]
CCL22	MDC, STCP-1	CCR4 [62, 63]	Thymus [68] Monocytes [63] Langerhans' cells [166] Epithelial cells [164]	Th2 lymphocytes [63] Monocytes [68] Dendritic cells [68] NK cells [68]
CCL24	Eotaxin-2	CCR3 [26-28]	Epithelial cells [151, 152] fibroblasts [167]	Eosinophils [27, 28] basophils [28]
CCL26	Eotaxin-3	CCR3 [29, 30], CCR2 [168]	IL4-treated HUVEC cells [29, 30] epithelial cells [151] fibroblasts [167]	Eosinophils [29, 30], basophils [169]
CXCL9	Mig	CXCR3 [170] CCR3 [106, 107]	Monocytes [171] macrophages and activated keratinocytes [112] Neutrophils [172]	Activated T-cells [171, 173] natural killer cells [98] malignant B-lymphocytes [174].
CXCL10	IP-10	CXCR3[170] CCR3 [106, 107]	Macrophages, endothelial cells and keratinocytes [112, 175] Neutrophils [172]	Activated T-cells and monocytes [173, 176], natural killer cells [98] malignant B-lymphocytes [174].
CXCL11	I-TAC	CXCR3 [101] CCR3 [106, 107] CCR5 [177]	Monocytes and astrocytes [101] macrophages and activated keratinocytes [112] Neutrophils [172]	Activated T-cells [101], natural killer cells [98] malignant B-lymphocytes [174].
CXCL12	SDF-1	CXCR4 [178, 179]	bone marrow stromal cells [180]	CD34+ progenitors [181], B-cell progenitors [116] lymphocytes and monocytes [182]

Figure 42: Tableau récapitulatif quelques chimiokines les plus représentatives des groupes CC et CXC ainsi que leur nom commun, leur récepteur et les cellules qui les produisent et celles qu'elles attirent (Pease 2006)

VII) LES POUMONS, CIBLES DES ALLERGENES

7.1) L'architecture pulmonaire

L'appareil respiratoire se divise en deux parties séparées par le pharynx : les voies aériennes supérieures comprenant une série de cavités communicantes (le nez, les sinus, le rhinopharynx) et l'appareil broncho-pulmonaire ([Site internet epathologie.com](http://Site%20internet%20epathologie.com)). Il est difficile de faire une étude sur l'asthme sans parler des cibles principales de cette pathologie, à savoir les poumons. Comme il a été dit précédemment, les poumons présentent une surface de 100m² en contact avec environ 10.000 litre d'air inhalé chaque jour, contenant de nombreux agents physiques, chimiques et biologiques potentiellement nocifs ([Holgate 2007](#)). Les poumons humains sont composés de trois lobes à droite et de deux lobes à gauche tandis que chez les souris ils sont composés de quatre lobes à droite et d'un seul lobe accessoire à gauche.

Cet organe essentiel est souvent comparé à un arbre, on parle d'ailleurs d'arborisation bronchique. Les bronches sont constituées de bronchioles qui aboutissent aux lobules, les plus petits compartiments anatomiques et fonctionnels du poumon. L'épithélium respiratoire de surface dans les voies hautes (depuis la trachée jusqu'aux bronchioles) est pseudo-stratifié, toutes les cellules étant ancrées dans la lame basale ([Coraux, Hajj et al. 2005](#)). La muqueuse pulmonaire est composée de trois structures : l'épithélium pulmonaire reposant sur une membrane basale riche en collagène IV et en laminine et sur du tissu conjonctif lâche, le chorion (lamina propria).

L'épithélium pulmonaire est constitué de cellules non ciliées de Clara et des cellules ciliées munies de cils vibratiles qui guident les particules et autres allergènes inhalés vers le larynx. Comme indiqué dans les chapitres précédents, l'épithélium pulmonaire se compose également de cellules caliciformes ou cellules en gobelet dont le volume augmente lors de la réponse allergique. Ce sont ces cellules qui produisent le mucus caractéristique de l'asthme. L'épithélium pulmonaire se compose également de cellules endocrines et de cellules basales qui sont de petites cellules situées entre les faces basales des cellules ciliées. Enfin, la dernière couche, le chorion, est formé de tissu conjonctif riche en fibres élastiques contenant des glandes mixtes séromuqueuses.

7.2) Le mucus, protection contre les allergènes

Le mucus est synthétisé par les cellules sécrétrices de l'épithélium de surface des voies aériennes et par les cellules sécrétrices glandulaires de la sous-muqueuse bronchique. Cette substance est considérée comme une barrière physique contre les bactéries et les

allergènes inhalés. En effet, sa composition biochimique (glycoprotéine, lactoferrine, composés antimicrobiens) participe à la défense antibactérienne, anti-oxydante et antiprotéasique de l'épithélium des voies aériennes (Coraux, Hajj et al. 2005). Les principales glycoprotéines constituant le mucus sont les mucines. Sécrétées au niveau des surfaces muqueuses et dans la salive, les mucines assurent une mission de protection des épithéliums des voies aériennes mais aussi digestives. Chez l'homme, il en existe 13 dont la plus connue est MUC5AC qui est retrouvée dans les voies respiratoires des sujets sains et est surproduite chez les sujets asthmatiques (Shifren 2012). Parmi les autres composés constituant le mucus se trouvent d'autres molécules connues pour leurs activités anti-microbiennes (IgA sécrétoires, lactoferrine, lysozyme, bronchotransferrine, phospholipase A2, lactoperoxydase, inhibiteur de leucoprotéase sécrétoire (SLPI) et défensines) (Coraux, Hajj et al. 2005).

7.3) Le microbiome pulmonaire, aire biotique du microbiote

L'étude du microbiome pulmonaire est un champ d'investigation relativement nouveau qui s'est développé ces dernières années. En effet, jusque là les poumons étaient considérés comme stériles en conditions physiologiques mais des études récentes ont démontré l'existence de bactéries résidentes dans les voies aériennes constituant un microbiome pulmonaire comparable à la flore intestinale retrouvée dans le tube digestif (Beck, Young et al. 2012). Il a été démontré que la composition microbienne de la flore aérienne était différente entre un sujet sain et un sujet atteint d'une inflammation chronique telle que l'asthme ou les maladies pulmonaires chroniques obstructives comme la fibrose kystique (Gollwitzer and Marsland 2014). Plusieurs données épidémiologiques ont révélées un lien entre l'exposition précoce aux microorganismes et l'incidence de l'asthme, d'où le développement de l'hypothèse de l'hygiène. Cette hypothèse suggère que le changement de style de vie dans les pays industrialisés ainsi que l'utilisation accrue des antibiotiques, peut altérer la composition microbienne et augmenter le risque de développement de l'asthme (Mamessier, Botturi et al. 2005; Gollwitzer and Marsland 2014). Le microbiome est en quelque sorte l'aire de vie du microbiote. Les voies respiratoire des patients asthmatiques présentent une augmentation significative de protéobactéries (Proteobacteria), spécifiquement les espèces *Haemophilus*, *Moraxella* et *Neisseria* spp. Inversement, le phylum Bacteroidetes, en particulier *Prevotella* spp ne sont pas représentés dans les voies respiratoires des sujets asthmatiques par rapport aux sujets sains (Gollwitzer and Marsland 2014). Des études ont été menées sur des souris axéniques dites « germ-free » qui sont totalement stérile et n'ont aucun microbes. Ces souris exprimaient une forte réponse Th2 ainsi qu'un fort taux d'éosinophiles dans les poumons et dans le lavage broncho-alvéolaire

comparé à des souris ayant un microbiote normal. Cependant, cet effet pourrait être dû à une colonisation des voies respiratoires des souris axéniques par un microbiote sain avant les sensibilisations à l'allergène (Gollwitzer and Marsland 2014) (Marsland, Yadava et al. 2013). De plus, chez les souris « germ-free », l'absence de micro-organismes conduit à la dérégulation de l'activation des cellules dendritiques et des macrophages, cellules piliers dans la réponse inflammatoire pulmonaire (Marsland, Yadava et al. 2013).

En se basant sur les multiples études menées par diverses équipes, l'existence d'un microbiome pulmonaire est clairement établie. Cependant des questions restent en suspens au sujet de sa fonction et de la manière dont on peut l'utiliser afin de prévenir ou de traiter les pathologies pulmonaires chroniques comme l'asthme.

VIII) LES MODELES D'ASTHME ALLERGIQUE CHEZ LA SOURIS

Lorsque l'on cherche sur internet « Ethique : expérimentation animale », la première référence qui nous est proposée est celle du CNRS qui écrit : « Malgré le développement de méthodes alternatives en expérimentation animale, l'utilisation des animaux à des fins scientifiques reste à l'heure actuelle incontournable ». En effet, afin de comprendre les mécanismes impliqués dans les pathologies comme l'asthme allergique, le recours à des modèles animaux est inéluctable. Le modèle murin est le plus utilisé pour leur disponibilité dans le monde entier et leur coût entre autre (Gueders, Paulissen et al. 2009). De plus, les cartes génétiques du génome de la souris sont disponibles, permettant la conception et l'utilisation de plusieurs outils moléculaires (anticorps, kit ELISA, ARN interférence (siRNA) et séquences anti-sens par exemple), sans oublier le fait que l'homme et la souris possèdent presque 86% d'homologie de séquence

Dans cette partie seront développés quelques modèles murins d'inflammation pulmonaire allergique. Les modèles suivants seront abordés : l'asthme induit par l'ovalbumine (OVA) présente dans le blanc d'œuf, l'induction de la pathologie par les allergènes d'acariens aussi appelés House Dust Mite (HDM) ou par la papaïne (PAP), une enzyme présente dans le latex de la papaye, et enfin, l'asthme induit par le pollen de bouleau ou Birch Pollen (BP).

8.1) Le modèle ovalbumine (OVA)

L'ovalbumine est une protéine fortement immunogène présente dans le blanc d'œuf. Le modèle le plus classique d'asthme allergique est obtenu par sensibilisation sous-cutanée

à l'ovalbumine en présence ou en absence d'adjuvant comme l'hydroxyde d'aluminium (Alum), suivie de provocations allergéniques par voie intra-nasale (instillation) (**Figure 43**).

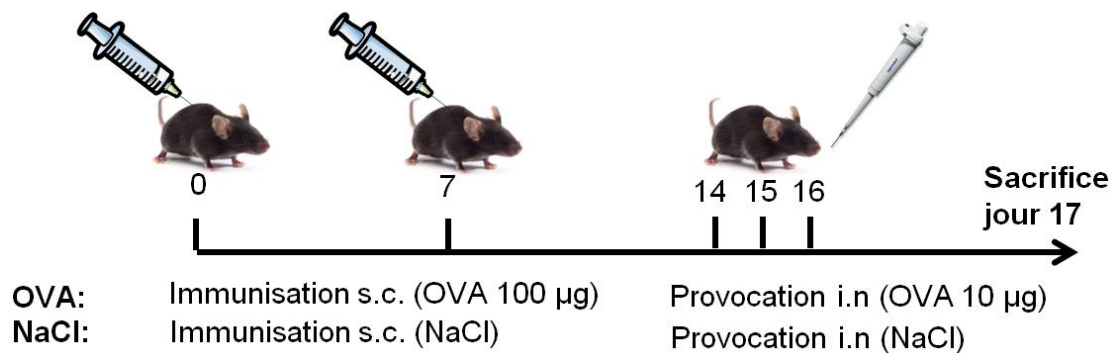


Figure 43 : Modèle expérimental murin d'inflammation pulmonaire induite par l'ovalbumine (OVA) utilisé à l'Institut.

L'administration de l'ovalbumine par injection sous-cutanée permet une diffusion plus lente de l'allergène et facilite sa capture par les cellules dendritiques et les cellules de Langherans présentent en grand nombre sous la peau. La co-administration d'adjuvant avec l'ovalbumine permet une orientation vers la réponse Th2 (Brewer, Conacher et al. 1999). Cependant, en orientant la réponse immunitaire ainsi, l'utilisation d'alum peut masquer l'existence essentielle de signaux inflammatoires ou les différences phénotypiques entre les souris sauvages et knock-out (Schmitz, Kurrer et al. 2003).

Les fonds génétique les plus utilisées dans les modèles d'asthme expérimentaux sont les BALB/c et les C57BL/6. Cependant, il existe quelques différences entre ces souris autre que leur couleur. En effet, les souris BALB/c et les C57BL/6 présentent une première différence au niveau d'un loci correspondant au loci humain 5q23-35 qui contient le cluster de gène de la réponse Th2. Des études réalisées sur un modèle d'inflammation pulmonaire induit par l'ovalbumine ont montrées que les souris BALB/c présentaient une plus forte réponse Th2 que les souris C57BL/6 ainsi qu'une meilleure réponse à la métacholine et un taux d'IL-4 et d'IL-13 plus important dans les poumons (Gueders, Paulissen et al. 2009). Cependant, les souris C57BL/6 présentent un recrutement d'éosinophiles et de neutrophiles plus prononcé dans le lavage bronchoalvéolaire ainsi qu'un taux de chimiokines CCL11 et CCL5 dans le lavage broncho-alvéolaire supérieur. Ainsi, il existe une distribution de cytokines différentes dans le lavage broncho-alvéolaire ou dans les poumons en fonction de la lignée de souris (Gueders, Paulissen et al. 2009).

L'administration d'ovalbumine aux souris révèle des caractéristiques de la pathologie asthmatique de l'Homme : éosinophilie, production de médiateurs Th2, hyperplasie des cellules caliciforme, production d'IgE spécifique de l'antigène, hyperréactivité bronchique en réponse à la métacholine.

8.2) Le modèle House Dust Mite (HDM)

House Dust Mite (HDM) est l'aéroallergène le plus répandu et le plus commun. En effet, 85% des asthmatiques sont allergiques à HDM. Les deux espèces d'acarien les plus connues sont *Dermatophagoides pteronyssinus* et *Dermatophagoides farinae*. Elles ont chacune leur allergène associé Der p et Derf. Cependant, HDM n'est pas seulement responsable d'asthme allergique mais également de rhinite, de rhinoconjonctivite et de dermatite atopique (Gregory and Lloyd 2011). Le modèle d'asthme allergique induit par l'allergène d'acarien est obtenu par instillation intra-nasale de HDM, suivie de provocations allergéniques par voie intra-nasale également (Figure 44).

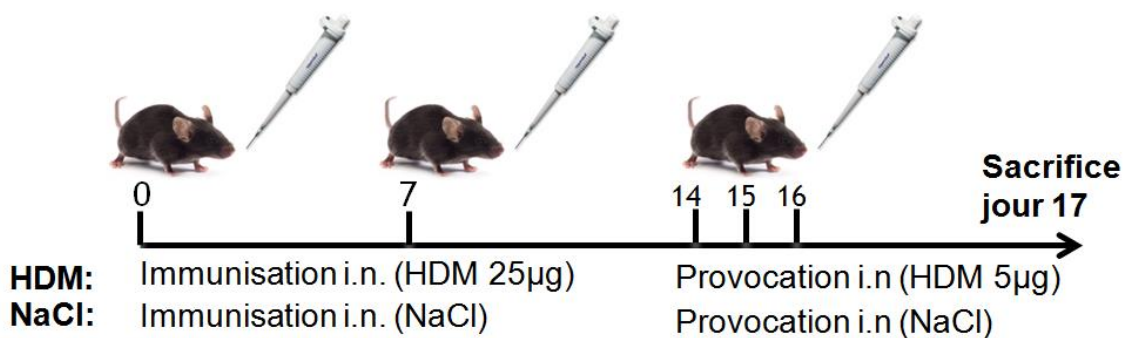


Figure 44 : Modèle expérimental murin d'inflammation pulmonaire induite par House Dust Mite (HDM) utilisé à l'Institut.

Le potentiel allergénique de HDM est contenu dans les acariens eux-mêmes ainsi que dans leurs pelotes fécales. Ces pelotes contiennent la nourriture des acariens, des débris et des enzymes protéolytiques liés ensemble par du mucus et recouvert par une membrane péritrophique chitineuse. La durée de vie d'un acarien est de 10 semaines et chaque acarien produit environ 2000 particules fécales, d'où le problème majeur de l'asthme allergique induit par HDM. Les allergènes appartiennent à une famille de protéine dont les fonctions biologiques sont diverses. Der p1 par exemple est le membre le plus connu de la famille *Dermatophagoides pteronyssinus* (Gough, Schulz et al. 1999). Il s'agit d'une cystéine-protéase (papain-like) jouant un rôle dans la rupture des jonctions serrées au niveau des cellules épithéliales (tout comme Der p3), dans la production de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, dans la dégranulation des éosinophiles et des mastocytes, dans la production de collagène et la maturation des fibroblastes. Der p2, un autre membre de la même famille est un domaine de reconnaissance des lipides liés à MD-2, une protéine associée au TLR4 (Figure 9) (Gregory and Lloyd 2011). De plus, des ligands des PRR (LPS, β -glucane) sont détectés dans les extraits de HDM (Figure 40), favorisant la réponse

allergique. La chitine formant l'exosquelette des acariens stimule également le système immunitaire.

Le modèle murin d'inflammation pulmonaire induit par HDM est donc primordial dans la compréhension du rôle de l'allergène d'acarien dans l'induction de l'immunité innée. Il pourrait aider au développement de stratégies thérapeutiques pour le traitement de l'asthme allergique.

8.3) Le modèle papaïne (PAP)

La papaïne est une enzyme présente dans le latex entre l'écorce et la pulpe de la papaye (*Carica papaya*). Cette cystéine protéase est largement utilisée dans l'industrie alimentaire en tant qu'attendrisseur de viande, en tant qu'agent de clarification de la bière et dans de nombreux produits pharmaceutiques contre les troubles digestifs par exemple. En effet, la papaïne est une enzyme semblable à celles produites naturellement dans l'estomac.

Malgré toutes ces vertus, il a été démontré que la papaïne était un allergène pouvant induire une forte réponse de type Th2 (Chambers, Brown et al. 1998). Plus récemment, il a été démontré que la réponse Th2 induite par la papaïne était initiée par l'IL-4 produite par les basophiles et par l'établissement d'une coopération entre les cellules dendritiques dermiques et les basophiles (Sokol, Barton et al. 2008). Cependant, la papaïne peut également induire l'asthme chez des souris déficientes pour Rag (recombination-activating genes), suggérant ainsi la présence d'un mécanisme indépendant des cellules Th2 (Motomura, Morita et al. 2014).

Le modèle d'inflammation pulmonaire induit par la papaïne est obtenu par une ou plusieurs instillations intra-nasales de papaïne (Figure 45).

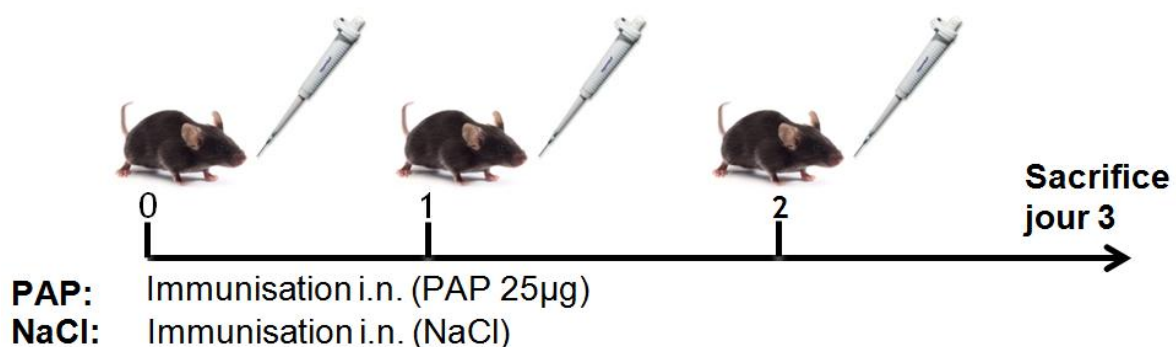


Figure 45 : Modèle expérimental murin d'inflammation pulmonaire induite par la papaïne (PAP) utilisé à l'Institut.

Les mécanismes impliquant la papaïne ne sont pas encore tout à fait connus et le modèle murin d'inflammation pulmonaire induit par cet enzyme devrait nous fournir de plus amples informations dans les années à venir.

8.4) Le modèle pollen de bouleau (BP, birch pollen)

Certaines allergies se déclarent de manière saisonnière; c'est le cas de l'asthme allergique induit par le pollen de bouleau (BP, birch pollen). Durant la saison des allergènes aéroportés, débutant fin janvier dans le sud de la France et début avril dans le nord de la France, le pollen de bouleau est l'un des principaux allergènes induisant des réponses allergiques asthmatiques. De plus, 90% des patients allergiques au pollen de bouleau sont plus particulièrement allergique à un de ces composants, la protéine Bet v1 (Tourdot, Airouche et al. 2013).

Le modèle d'inflammation pulmonaire induit par le pollen de bouleau est obtenu par sensibilisation intra-péritonéal au pollen de bouleau, suivie de provocations allergéniques par voie intra-nasale (instillation) (Figure 46).

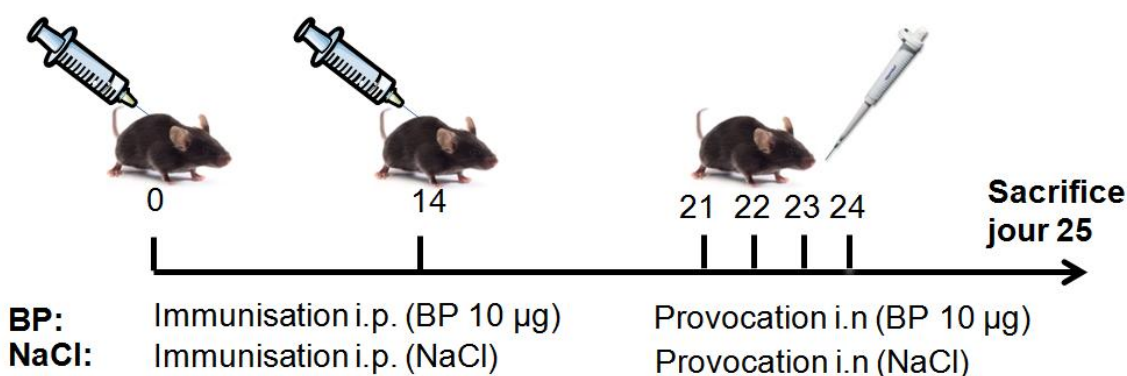


Figure 46 : Modèle expérimental murin d'inflammation pulmonaire induite par le pollen de bouleau (BP, birch pollen) utilisé à l'Institut. L'allergène utilisé est plus particulièrement Bet v1.

Les souris sensibilisées avec le pollen de bouleau présentent une hyperréactivité bronchique ainsi qu'une forte éosinophilie associée à la production d'IgE spécifiques de Bet v1 (Tourdot, Airouche et al. 2013). La mise au point de ce modèle expérimental serait la meilleure manière de comprendre les voies de signalisation induites par l'allergène Bet v1.

OBJECTIFS

Mes travaux sont orientés en deux grands axes : d'une part l'étude du rôle de la caspase-1 et de l'IL-33 et d'autre part celui de la protéine kinase C θ (PKC θ) dans un modèle d'asthme allergique expérimental induit par HDM.

Comme décrit dans la partie introduction, la caspase-1 est une cystéine protéase endogène synthétisée sous forme d'un précurseur inactif (la pro-caspase-1) et activée par dimérisation et autoprotéolyse par un complexe multiprotéique composé de NLRP3 et de la protéine adaptatrice ASC, appelé inflammasome. La caspase-1 est connue entre autre pour son implication dans l'activation de l'IL-1 β et de l'IL-18. Le rôle de la caspase-1 vis-à-vis de l'IL-33 a fait l'objet de nombreuses controverses. En effet, une première étude a montré que le clivage de l'IL-33 par la caspase-1 activait la cytokine (Schmitz, Owyang et al. 2005) alors que d'autres ont démontré que ce clivage inactivait l'IL-33 (Cayrol and Girard 2009). C'est cette deuxième hypothèse de l'inactivation qui s'est vérifiée et qui est à présent acceptée. L'IL-33 est une cytokine ayant une implication majeure dans l'asthme allergique et dans l'exacerbation de la réponse Th2. Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre quels étaient les mécanismes mis en jeu dans l'asthme allergique en absence de l'inflammasome NLRP3, de la protéine adaptatrice ASC ou de la caspase-1. Nous avons mis en évidence une voie de signalisation alternative dépendante de l'IL-33, mise en place en absence de ces divers composants. De plus, nous avons démontré l'implication de l'IL-33 en administrant une protéine de fusion du récepteur ST2 soluble de l'IL-33 à des souris déficientes pour la caspase-1.

Lorsqu'un allergène franchit la barrière des cellules épithéliales, il est pris en charge par des cellules présentatrices d'antigène, les cellules dendritiques. Ces cellules dégradent l'allergène en petits peptides puis migrent vers les ganglions lymphatiques où elles présentent ces peptides aux lymphocytes T non différenciés. Cette reconnaissance s'effectue via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) exprimé par les cellules dendritiques et le récepteur exprimé par les cellules T (TCR) au niveau de la synapse immunologique. Le recrutement de PKC θ dans la synapse immunologique est nécessaire pour l'activation et la prolifération des cellules T. En effet, la protéine kinase C θ joue un rôle crucial dans l'activation des cellules T et dans la réponse Th2 dans plusieurs pathologies dont l'asthme allergique.

L'étude de la protéine kinase C θ dans l'asthme allergique induit par HDM a constitué le second axe de mes travaux de thèse. En effet, aucunes données de la littérature ne démontrent le rôle de PKC θ dans la réponse innée. C'est pourquoi nous nous sommes

intéressés à l'impact de PKC- θ sur le recrutement des ILC2 dans les poumons de souris rendues asthmatiques par administrations répétées de HDM d'une part. La prolifération des ILC2 est stimulée par des cytokines sécrétées par les cellules épithéliales (IL-25, IL-33) et elles sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-13). Dans une autre partie de ce projet, nous avons émis une hypothèse de mécanisme régit par PKC θ dans l'asthme allergique induit par HDM. Enfin, les caractéristiques de l'asthme étant significativement diminuées en absence de PKC θ , nous avons étudiés l'effet de l'administration d'un inhibiteur de cette protéine à des souris sauvages, utilisé pour la première fois *in vivo*.

La partie « Résultat » qui suit s'articule ainsi en deux chapitres, chacun correspondant à un axe de ma thèse et à un article en soumission. L'ensemble de ces données met en évidence des voies de signalisation qui pourrait servir de cibles thérapeutiques potentielles : la caspase-1, l'IL-33 et la protéine kinase C θ .

RESULTATS

1^{ère} partie (Article 1): L'activation de la caspase-1 par l'inflammasome NLRP3 inhibe l'inflammation pulmonaire dépendante de l'IL-33 induite par l'allergène d'acarien HDM (House Dust Mite).

Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33 dependent house dust mite induced allergic lung inflammation

Fahima Madouri^{1,2}, Noëlline Guillou¹, Louis Fauconnier², Tiffany Marchiol², Nathalie Rouxel², Pauline Chenuet¹, Aurélie Ledru², Lionel Apetoh^{3,4,5}, François Ghiringhelli^{3,4,5}, Mathias Chamaillard⁶, Fabrice Trovero², Valérie F.J. Quesniaux¹, Bernhard Ryffel^{1,*}, and Dieudonnée Togbe^{1,2,*}.

Résumé

Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire et ceux de la littérature ont montré le rôle critique de l'inflammasome NLRP3 dans l'asthme allergique induit par l'ovalbumine. Bien que le rôle de la caspase-1 ne soit pas réellement établi dans cette pathologie. Certaines études ont mis en évidence son implication dans l'inactivation de l'IL-33, cytokine clé de la réponse allergique.

Mes travaux de thèse ont porté sur le rôle de la caspase-1 ou ICE (IL-1 Converting Enzyme) dans un modèle d'inflammation pulmonaire induite par HDM. Il s'agit d'une cystéine protéase intracellulaire synthétisée sous forme d'un précurseur, la pro-caspase-1. Elle est activée par clivage autoprotéolytique en deux sous-unités : la p20 et la p10, chacune formant un hétérodimère. Ce clivage s'effectue grâce à une dimérisation avec un complexe multiprotéique : l'inflammasome. Cette plateforme reconnaît une protéine adaptatrice nommée ASC puis une protéine effectrice, la caspase-1. Plusieurs inflammasomes sont capables d'activer la caspase-1 mais durant cette étude nous nous sommes intéressés à deux d'entre eux : NLRP3 et NLRC4 (IPAF). Une fois activée, la caspase-1 est capable de cliver à son tour d'autres substrats. Les plus étudiés sont les cytokines IL-1 β et IL-18, toutes deux synthétisées sous une pro-forme et activées par la caspase-1. Ainsi, cette protéase est un médiateur clé dans les processus inflammatoires (Martinon, Mayor et al. 2009; Lukens, Gross et al. 2012). Elle joue également un rôle dans la mort cellulaire programmée, la pyroptose en réponse aux bactéries intracellulaires.

Dans un premier temps nous avons montré que la caspase-1 ainsi que les composants de l'inflammasome NLRP3 et ASC régulent l'inflammation pulmonaire. En effet,

nous avons montré une exacerbation des caractéristiques de l'asthme chez les souris déficientes pour la caspase-1 après immunisation et provocation avec l'allergène d'acarien HDM. En effet, les souris caspase-1^{-/-} présentaient un recrutement cellulaire, une éosinophilie, une hyperréactivité bronchique, une production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et une production de mucus significativement plus élevée que les souris sauvages traitées avec le même allergène. Nous nous sommes intéressés à l'implication de l'inflammasome NLRP3 et de la protéine adaptatrice ASC dans ce phénotype allergique et il s'est avéré que les souris déficientes pour NLRP3 ou ASC présentaient également les mêmes caractéristiques. En revanche, nous n'avons observé aucune différence entre les souris sauvages traitées avec l'allergène et les souris déficientes pour NLRC4, excluant ainsi l'implication de cet inflammasome dans le mécanisme.

Bien que la caspase-1 vis-à-vis de l'IL-33 ait fait l'objet de nombreuses controverses, ce fait est à présent établi. Exprimée de manière prédominante dans les cellules non hématopoïétiques comme les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales, l'IL-33 est libérée lors de la nécrose liée aux dommages causés à ces cellules sous une forme entière active (full-length). Il a été montré que les dommages causés par les protéases des allergènes aux macrophages et cellules dendritiques leur permettaient également de sécréter l'IL-33 (Palmer and Gabay 2011). Cette cytokine se fixe sur son récepteur membranaire ST2 exprimé à la surface des mastocytes, des granulocytes, des cellules Th2 et des cellules lymphoïdes innées (ILC2) et engendre une réponse inflammatoire de type Th2 (production des cytokines IL-4, IL-5, IL-13) (Lefrançois and Cayrol 2012). En revanche si elle est reconnue par son récepteur ST2 soluble (sST2), elle sera inhibée (Hayakawa, Hayakawa et al. 2007). L'IL-33 peut être clivée par d'autres protéases comme la cathepsine G et l'élastase des neutrophiles ou par d'autres caspases, les caspases 3 et 7.

Lors de cette étude nous nous sommes intéressés au rôle de la caspase-1 et de l'inflammasome NLRP3 dans un modèle expérimentale d'inflammation pulmonaire induit par l'allergène d'acarien House Dust Mite (HDM). Nous avons montré l'existence d'une voie de signalisation alternative à celle déjà connue NLRP3/Caspase-1 conduisant à l'inflammation pulmonaire en absence de ces deux composés et observé les conséquences quand à la production et aux fonctions de l'IL-33.

Sachant que l'IL-33 est une cytokine jouant un rôle dans l'exacerbation de la réponse Th2 à un allergène et que le clivage de cette cytokine par la caspase-1 l'inactive, nous avons cherché à déterminer si l'augmentation de l'inflammation observée chez les souris déficientes pour la caspase-1 était due à l'implication de l'IL-33. Nous avons observé une surexpression de l'IL-33 dans les poumons des souris après immunisation et provocation allergénique à la fois de la forme entière que des formes clivées. De plus, l'administration aux souris caspase-1^{-/-} d'une protéine de fusion jouant un rôle de leurre tout comme le récepteur soluble de l'IL-33 (sST2) a pour conséquence une diminution de la réponse asthmatique à HDM, prouvant ainsi le rôle fondamental de l'IL-33 dans ce mécanisme.

Il a été démontré que la libération d'acide urique dans les voies respiratoires amplifiait la réponse Th2 induit par HDM dans un mécanisme NLRP3-indépendant (Kool, Willart et al. 2011). De plus, il a été montré que l'acide urique induisait une réponse immunitaire de type Th2 en activant les cellules dendritiques de manière Syk-dépendant (spleen tyrosine kinase). Au cours de cette étude, nous avons proposé l'hypothèse que l'augmentation des caractéristiques de l'asthme chez les souris caspase-1^{-/-} en réponse à HDM passerait par un mécanisme dépendant de la production d'acide urique et la voie de la protéine Syk. Ce mécanisme induirait de manière indirecte l'augmentation de la production de l'IL-33, qui ne peut pas être inactivée en absence de la caspase-1. L'IL-33 produite pourrait amplifier la réponse Th2 de manière concomitante avec ce mécanisme par une boucle de rétrocontrôle positif.

Les résultats présentés ci-dessous n'ont pas encore été publiés et sont en cours de révision au Journal of Molecular Cell Biology (JMCB).

Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33 dependent house dust mite induced allergic lung inflammation

Fahima Madouri^{1,2} , Noëlline Guillou¹ , Louis Fauconnier² , Tiffany Marchiol² , Nathalie Rouxel² , Pauline Chenuet¹ , Aurélie Ledru² , Lionel Apetoh^{3,4,5} , François Ghiringhelli^{3,4,5} , Mathias Chamaillard⁶ , Song Guo Zheng⁷ , Fabrice Trovero² , Valérie F.J. Quesniaux¹ , Bernhard Ryffel^{1,*} and Dieudonné Togbe^{1,2,*} .

¹ Laboratory of experimental and molecular immunology and neurogenetics (INEM), UMR 7355 CNRS-University of Orleans, 3B, rue de la Ferrollerie, F-45071 Orleans-Cedex2, France, University of Orleans.

² Artimmune SAS, 13 Avenue Buffon, 45100-Orléans, France.

³ Faculté de Médecine, University of Bourgogne, Dijon, France.

⁴ INSERM, U866, Dijon, France.

⁵ Centre Georges François Leclerc, Dijon, France.

⁶ CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, INSERM U1019 - Institut Pasteur – Lille.

⁷ Division of Rheumatology, Penn State Milton S. Hershey Medical Center, Hershey, PA 17033; Clinical Immunology Section, Third Affiliated Hospital at Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China; szheng1@hmc.psu.edu wuwpzhy@163.com.

*** Correspondence to:**

Dieudonné Togbe, PhD, Artimmune SAS ; 13, Avenue Buffon, 45100 Orléans, France. Phone: +332 38 25 79 80, Fax: + 332 38 25 79 79
dieudo.togbe@artimmune.com, dtogbe@cnrs-orleans.fr

Conflict of interest: the authors have no conflicting financial interests.

This article has an online supplement

ABSTRACT

The cysteine protease caspase-1 (Casp-1) contributes to innate immunity through the assembly of NLRP3, NLRC4, AIM2 and NLRP6 inflammasomes. Here we asked whether caspase-1 activation plays a regulatory role in house dust mite (HDM) induced experimental allergic airway inflammation. We report enhanced airway inflammation in caspase-1 deficient mice exposed to HDM with a marked eosinophil recruitment, increased expression of IL-4, IL-5 and IL-13, full-length and bioactive IL-33. Furthermore, mice deficient for NLRP3 failed to control eosinophil influx in the airways and displayed augmented Th2 cytokine and chemokine levels suggesting that the NLRP3 inflammasome complex controls HDM induced inflammation. IL-33 neutralization by administration of soluble ST2 receptor inhibited the enhanced allergic inflammation, while administration of recombinant IL-33 during challenge phase enhanced allergic inflammation in caspase-1 deficient mice. Therefore, we show that Caspase-1, NLRP3 and ASC but not NLRC4 contribute to the upregulation of allergic lung inflammation. Mechanistically, absence of caspase-1 is associated with increased expression of IL-33, uric acid and spleen tyrosine kinase (Syk) production. This study highlights a critical role of caspase-1 activation and NLRP3/ASC inflammasome complex in the down-modulation of IL-33 *in vivo* and *in vitro*, thereby the regulation of Th2 response in HDM induced allergic lung inflammation.

Key words: House dust mite, allergic asthma, caspase-1, inflammasomes, IL-33, spleen tyrosine kinase (Syk), uric acid.

INTRODUCTION

Allergic asthma is a chronic lung inflammation characterized by infiltration of eosinophils, type 2 innate lymphoid cells (ILC2) and lymphocytes (Th2) in the airways, increased production of IL-25, TSLP and IL-33, mucus overproduction leading to airway obstruction, and high specific IgE production in response to environmental allergens (Finkelman and Urban 2001; Lambrecht and Hammad 2012).

House dust mites (HDM) are one of the most frequent and major sources of allergens in more than 85% of asthmatic patients (Gregory and Lloyd 2011). HDM contains both cysteine proteases (Der p1; papain like protease) and serine proteases (Der p3, Der p6 and Der p9) (Gregory and Lloyd 2011). Exposure to HDM allergens induces rapid production of IL-25, TSLP and IL-33 by damaged epithelial cells and promotes ILC2 expansion and Th2 response (Hammad, Chieppa et al. 2009; Kearley, Buckland et al. 2009; Neill, Wong et al. 2010).

IL-33 was primarily discovered as a chromatin-associated nuclear factor and belongs to the IL-1 family of cytokines (Haraldsen, Balogh et al. 2009). IL-33 can be cleaved by caspase-1 for functional inactivation (Cayrol and Girard 2009; Zhao and Hu 2010). However, a tenfold higher bioactive IL-33 can be generated following pro-IL-33 cleavage by other proteases such as neutrophil elastase and cathepsin G, suggesting that bioactive IL-33 may be released into the extracellular environment (Lefrancais and Cayrol 2012; Lefrancais, Roga et al. 2012). IL-33 is mainly expressed in non hematopoietic cells such as fibroblasts, epithelial cells and endothelial cells (Moussion, Ortega et al. 2008; Kurowska-Stolarska, Stolarski et al. 2009; Luthi, Cullen et al. 2009). However, mucosal damage caused by allergens

elicits IL-33 production from macrophages, and inflammatory dendritic cells (DCs) (Prefontaine, Nadigel et al. 2010; Palmer and Gabay 2011). Further, IL-33 amplifies IL-13 mediated polarization of alternatively activated macrophages with increased levels of CCL17 and CCL24, which contribute to airway inflammation (Kurowska-Stolarska, Stolarski et al. 2009).

Caspase-1 is an endogenous cysteine protease synthesized as inactive pro-caspase-1 and activated by dimerization and autoproteolysis within multiprotein complexes including ASC and NLRP3 called inflammasomes. Activated caspase-1 is required for IL-1 β and IL-18 release, cell death, and plays a key role in inflammation (Martinon, Mayor et al. 2009; Lukens, Gross et al. 2012).

Here we addressed the role of caspase-1 and NLRP3 inflammasome in HDM induced allergic airway inflammation. We report that caspase-1 deletion increases airway inflammation induced by HDM allergens as shown by a marked increase of eosinophil and inflammatory cell infiltration and Th2 responses, including IL-33 release. Furthermore, allergic inflammation in mice deficient for ASC and NLRP3 was augmented, together with increased levels of IL-33. Blockade of IL-33 signaling by soluble ST2 receptor inhibited the enhanced allergic inflammation seen in caspase-1 deficient mice. These data show that caspase-1 activation regulates IL-33 *in vivo* in response to HDM allergen.

RESULTS

Caspase-1 regulates eosinophil influx and lung inflammation in response to HDM allergen

Inflammasome complex activation recruits and activates caspase-1. We and others previously showed that NLRP3 inflammasome plays a critical role in ovalbumin induced allergic airway inflammation either in presence or in absence of aluminium salt adjuvant (Eisenbarth, Colegio et al. 2008; Besnard, Guillou et al. 2011). The allergen HDM causes asthma in many patients (Gregory and Lloyd 2011; Jacquet 2013). To investigate the role of caspase-1 and other inflammasome components in allergic lung inflammation, caspase-1 deficient mice (*Casp-1^{-/-}*) or wild type (WT) control C57BL/6 mice were immunized with HDM (25 µg by intranasal route at day 0 and 7), followed by three intranasal challenges (5 µg HDM on day 14-16) (Figure 1A). Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected 24 h after the last challenge and differential cell count performed. Increased eosinophils in the BALF and lung as well as airway hyperresponsiveness (AHR) to methacholine were observed in *Casp-1^{-/-}* mice as compared to WT mice, following HDM exposure (Figure 1B-D).

IL-1α is released by damaged cells in vivo and functions as alarmin to alert cells of the innate immune system upon tissue injury and to promote Th2 immunity to HDM allergens (Chen, Kono et al. 2007; Willart, Deswarte et al. 2012). We observed a significant increase in IL-1α levels in the lung homogenates of *Casp-1^{-/-}* mice compared to WT mice (Figure 1E), suggesting enhanced tissue damage upon exposure to HDM allergen.

Further, the level of Th2 cytokines IL-4, IL-5, IL-13 and Th2 chemokines CCL11, CCL17, CCL22 and CCL24 which are known to attract eosinophils, T lymphocytes

and dendritic cells in lung were significantly augmented in *Casp-1*^{-/-} mice as compared to WT (Figure 1 F - M). Histological analysis of *Casp-1*^{-/-} animals showed an increased inflammatory cell infiltration with goblet cells hyperplasia, mucus overproduction as assessed by PAS staining and Muc5ac mRNA expression (Figure 2A-D).

Taken together, our data showed enhanced lung inflammation and pathology in absence of caspase-1.

NLRP3 inflammasome, not NLRC4, is required for eosinophil recruitment following HDM allergen challenge

Since caspase-1 is activated by different inflammasome platforms, including NLRP3, ASC and NLRC4, we asked whether HDM induced caspase-1-dependent regulation involved NLRP3.

NLRP3 inflammasome was likely to be involved in the regulation of HDM induced allergic lung inflammation. Indeed *NLRP3*^{-/-} mice exposed to HDM showed an augmented eosinophilia in BALF and lung (Figure 3A and B), together with increased levels of IL-1 β , IL-13, CCL5, CCL17 and CCL22 (Figure 3C-E and G-H) while the increase levels of CCL11 and CCL24 did not reach statistical significance (Figure 3F and I). Histological analysis revealed exacerbated cell infiltration and mucus hypersecretion (Figure 3J-L).

We next hypothesized that among the NLRP3 dependent pathways, the ASC adaptor protein is essential to connect NLRP3 and caspase-1. ASC deficient mice (*ASC*^{-/-}) sensitized and challenged with HDM showed increased eosinophilia in BALF and lung (Supplementary Figure S1A and B) together with increased levels of Th2

cytokines and chemokines including IL-1 β , IL-33 (Supplementary Figure S1C and E), CCL5, CCL11, CCL17 and CCL24 as compared with WT control mice receiving HDM (Supplementary Figure S1F-H and J), and a slight, not statistically significant increase of IL-13 and CCL22 levels (Supplementary Figure S1D and I). Histological analysis confirmed that absence of ASC exacerbated lung inflammation with increased lung pathology (Supplementary Figure S1, K-M).

The NLRC4 inflammasome is important for caspase-1 activation to regulate host defense by controlling the release of IL-1 β and IL-18 (Franchi, Kamada et al. 2012). To exclude a role of NLRC4 in allergic airway inflammation, we investigated the HDM lung response in NLRC4 deficient mice (*NLRC4*^{-/-}) (Supplementary Figure S2A). Eosinophil recruitment in BALF and lung, expression of inflammatory cytokines and chemokines and allergic pulmonary inflammation was not different in NLRC4 deficient and WT mice (Supplementary Figure S2A-E).

Taken together, the data demonstrate that the NLRP3 inflammasome complex with ASC and caspase-1, but not NLRC4, contribute to the regulation of airway eosinophilia and Th2 cytokine and chemokine production in the allergic lung inflammation induced by HDM allergens.

Enhanced Th2 response in Caspase-1 deficient mice depends on pulmonary IL-33 expression upon HDM allergen exposure.

IL-33, a member of the IL-1 family is strong inducer of a Th2 driven airway inflammation and is a substrate for caspase-1 (Liew, Pitman et al. 2010). IL-33 is cleaved by caspase-1 after ASP₁₇₈ residue to an inactive form, while other proteases including cathepsin G and neutrophil elastase to bioactive forms (IL-33_{95–270}, IL-33_{99–}

²⁷⁰ and IL-33₁₀₉₋₂₇₀), which have tenfold higher biological activity than the full length IL-33 (Cayrol and Girard 2009; Lefrancais, Roga et al. 2012). To determine whether enhanced pulmonary eosinophil recruitment observed in the airways of *Casp-1*^{-/-} mice exposed to HDM may be linked to IL-33, we analyzed the expression of IL-33 in the lung of HDM treated WT and *Casp-1*^{-/-} mice.

We found a significant increase of IL-33 mRNA expression and IL-33 protein levels in the lungs of *Casp-1*^{-/-} mice compared to WT mice (Figure 4A and B). Western blot analysis revealed increased full-length IL-33 (34 kDa) and highly bioactive IL-33 (21 and 18 kDa), corresponding to Cathepsin G and neutrophil elastase cleavage products (Figure 4C).

The processing of pro-caspase-1 into its p20 and p10 subunits is a hallmark of caspase-1 activation. Consistent with this, we found an increased caspase-1 p20 subunit in the lung homogenates of WT mice, but not of *Casp-1*^{-/-} mice in response to HDM exposure (Figure 4D), which may explain increased expression of full length IL-33 in the absence of caspase-1.

IL-1 β is cleaved into its mature form by caspase-1. Total IL-1 β levels in lung homogenate from *Casp-1*^{-/-} mice was increased as compared to WT mice (Figure 4E), which was mainly due to pro-IL-1 β as determined by Western blot analysis (Figure 4F).

Therefore, full length and processed IL-33 expression are augmented in the absence of caspase-1. These data suggests that endogenous caspase-1 restrains IL-33 production and function, acting as a suppressor of the allergic response.

Uric acid released in the airways upon HDM exposure has been identified as an essential initiator and amplifier of HDM allergen induced type 2 immunity through NLRP3-independent mechanisms (Kool, Willart et al. 2011; Kuroda, Ishii et al. 2011).

Therefore we determined uric acid levels in BALF after HDM allergen induced inflammation and found increased levels of uric acid in the BALF of *Casp-1^{-/-}* mice compared to WT mice treated with HDM allergen (Figure 4G) suggesting that uric acid indeed might amplify the inflammatory response.

Moreover, uric acid induces Th2 cell immunity by triggering DC activation in a spleen tyrosine kinase (Syk)-dependent manner (Kool, Willart et al. 2011; Kuroda, Ishii et al. 2011). Total Syk protein was indeed increased in the lung of *Casp-1^{-/-}* mice suggesting caspase-1 dependent Syk kinase regulation as well as GM-CSF production (Figure 4H-I).

Therefore, the data suggest that in the absence of caspase-1, an alternative pathway associating cell injury, enhanced uric acid via Syk kinase activation is critical for the amplification of lung inflammation in response to HDM.

IL-33 blockade with muST2-Fc fusion protein reduces the development of Th2 immunity to HDM in caspase-1 deficient mice

IL-33 is a specific ligand for ST2, the IL-33 receptor (Schmitz, Owyang et al. 2005), and drives Th2 responses (Townsend, Fallon et al. 2000; Oboki, Ohno et al. 2010). To examine whether the increased IL-33 production upon HDM exposure contributes to the exacerbation of airway inflammation in *caspase-1* deficient mice, we administered a murine ST2-Fc fusion protein (muST2-Fc) to *Casp-1^{-/-}* mice during the immunization phase only (Figure 5A). Soluble muST2 protein has previously been shown to abrogate IL-33 activity *in vitro* and *in vivo* (Palmer, Lipsky et al. 2008; Smithgall, Comeau et al. 2008). Murine ST2–Fc fusion protein treatment significantly reduced the exacerbated eosinophil recruitment in BAL and lung tissue seen in

Casp-1^{-/-} mice (Figure 5B and C). Furthermore, muST2–Fc fusion protein significantly inhibited the production of IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-13, IL-33 and CCL11, CCL17, CCL20, CCL22 and CCL24 in lung and uric acid in BALF after HDM exposure (Figure 5D-O). Moreover, cell infiltration, mucus overproduction and Muc5ac mRNA expression in lung were significantly reduced by muST2–Fc fusion protein treatment in HDM exposed *Casp-1^{-/-}* mice (Figure 5P-S).

Overall, these data emphasize a critical role played by IL-33 in the exacerbation of lung eosinophilia in *Casp-1^{-/-}* mice and IL-33 neutralization attenuates lung inflammation.

IL-33 increased airway inflammation and induce uric acid in the absence of caspase-1.

To investigate whether recombinant (rm) IL-33 alone can induce exacerbated airway inflammation and the production of uric acid in the absence of caspase-1, we treated WT and *Casp-1^{-/-}* mice with IL-33 recombinant protein (three time by intranasal route) (Figure 6A). Increased eosinophils in the BALF were observed in *Casp-1^{-/-}* mice as compared to WT mice, following rmIL-33 exposure (Figure 6B). Furthermore, uric acid was increased in lung of *Casp-1^{-/-}* mice treated with IL-33 (Figure 6C). Therefore, IL-33 augment uric acid release which is NLPR3 and caspase-1 independent amplifying the inflammatory response via Syk kinase downstream of IL-33/ST2.

Macrophages are critical producers of IL-33 in response to HDM stimulation.

Since the population of lung macrophages was augmented after HDM sensitization, we next investigated whether macrophages express IL-33 during HDM induced lung inflammation. We cultured *in vitro* bone marrow derived macrophages (BMDM) and primary fibroblasts from WT or *Casp-1*^{-/-} mice, human monocytic (THP-1) or epithelial cell lines (BEAS-2B), and stimulated them with HDM (Figure 7). HDM increased IL-33 protein in macrophages, and IL-33 levels were significantly higher in cell lysate from *Casp-1*^{-/-} BMDM as compared to WT BMDM, while IL-1 α levels were similar (Figure 7A). We obtained similar results using alveolar macrophages from *Casp-1*, ASC and NLRP3^{-/-} deficient mice (data not shown).

Therefore HDM activates macrophages to produce IL-33 which is regulated by caspase-1 *in vitro*. Moreover, IL-33 protein was released in the supernatant of THP-1 (Figure 7B) and BEAS-2B (Figure 7C) cell lines stimulated with HDM extracts.

However, IL-33 was undetectable in the cell lysate or supernatants from fibroblasts stimulated with HDM (data not shown). To verify that fibroblasts can produce other cytokines in response HDM extracts stimulation, we measured TNF α , IL-6 and KC (CXCL1) protein levels in fibroblast supernatants. Interestingly, TNF α , IL-6 and KC levels were significantly increased in fibroblasts from *Casp-1*^{-/-} mice compared to WT (Figure 7D), which suggest that upon HDM exposure other inflammatory mediators are regulated by caspase-1 and might contribute to the enhanced inflammatory response.

Caspase-1 activation is accompanied by an efficient secretion of mature IL-1 β and cell death (Broz, Newton et al. 2010). Caspase-1 deficient macrophages or dendritic cells stimulated with HDM extracts had drastically reduced IL-1 β release while similar TNF α levels were seen in WT cells (Supplementary Figure S3A-D). Importantly,

HDM stimulation caused higher cell death than LPS stimulation in WT macrophages, while *Casp1*^{-/-} macrophages showed less cell death after HDM stimulation (Supplementary Fig S4A), indicating that IL-1 β release by macrophages and cell death was dependent on caspase-1 *in vitro*.

Thus, macrophages and epithelial cells, but not fibroblasts produced IL-33 in response to HDM which was enhanced in the absence of casp-1 and NLRP3, supporting a regulatory role of the inflammasome for IL-33 production.

DISCUSSION

A regulatory role of caspase-1 on IL-33 release and regulation of HDM induced lung inflammation has so far not been reported, while several studies investigated the role of caspase-1 on cell death and IL-1 β release *in vitro* and *in vivo*.

Here, we have uncovered a novel critical regulatory role of caspase-1 on the Th2 dependent allergic response to HDM allergen. HDM-induced Th2 responses result from the damaging effects of protease-containing allergens on airway epithelia. We demonstrate here that caspase-1 and NLRP3 activation attenuates HDM induced allergic lung inflammation with reduced eosinophil recruitment and IL-33 production. Up-regulation of HDM induced airway inflammation in caspase-1 deficient mice revealed increased Th2 cytokine production. The increased Th2 response correlated with higher IL-33 production which promotes airway inflammation with increased eosinophil influx in the lung, consistent with the notion that IL-33/ST2 signaling is critical for Th2 development (Townsend, Fallon et al. 2000).

Neutralization of IL-33 by muST2-Fc fusion protein during the immunization phase of HDM induced lung inflammation diminished allergic airway inflammation and was associated with a reduced expression of IL-1 α , IL-1 β , IL-5 and IL-33. Our data are consistent with earlier reports that ST2 deletion or blockade impairs type 2 responses *in vivo* in other models (Coyle, Lloyd et al. 1999; Townsend, Fallon et al. 2000).

The molecular and cellular mechanisms that initiate IL-33 release *in vivo* remain a topic of considerable debate and controversy. In mouse and human tissues, IL-33 is constitutively expressed in endothelial cells and in some epithelial cells (Carriere, Roussel et al. 2007; Prefontaine, Lajoie-Kadoch et al. 2009; Pastorelli, Garg et al. 2010; Prefontaine, Nadigel et al. 2010). Regulated expression of IL-33 has been reported in cultured mouse and human myeloid cells, such as

monocytes/macrophages or DCs (Ohno, Oboki et al. 2009; Nile, Barksby et al. 2010; Shimosato, Fujimoto et al. 2010).

We detected a significant increase of intracellular IL-33 protein expression in murine macrophages and human myeloid THP1 cells upon HDM extract stimulation. Other cell types such as airway epithelial cells might be activated by HDM to release IL-33 and we detected a modest IL-33 protein expression in BEAS-2B, a human epithelial cell line. Our data support the notion that IL-33 plays an important role in innate rather than acquired immunity. This finding is also in agreement with observations in IL-33-deficient mice (Oboki, Ohno et al. 2010). Consistent with our findings, expression of IL-33 has been demonstrated in the lungs of patients with severe asthma (Prefontaine, Nadigel et al. 2010), and IL-33 has also been identified as a susceptibility gene for human asthma in genome-wide association studies (Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009; Moffatt, Gut et al. 2010).

A key finding from our studies is that caspase-1 restrains the expression of full length and bioactive, cleaved IL-33, which in turn attenuates inflammation, since the expression of full length and cleaved IL-33 are drastically increased in *Casp-1* deficient mice. This is an unexpected and novel finding which has not been reported hitherto. We confirmed absence of *casp-1* mRNA and protein in *Casp-1*^{-/-} mice. A contribution by caspase-11 cannot be excluded as the mice used in this study were recently shown to be also deficient for caspase-11, which is engaged by non-canonical inflammasome activation (Kayagaki, Warming et al. 2011). Therefore the inactivation of Casp-11 (known also as Casp-4) could be involved in the unleashed inflammation seen in the double *Casp-1/11* deficient mice exposed to the HDM allergens. The role of a non-canonical inflammasome, which might be controlled by caspase-11, needs to be further investigated.

Further, caspase-1, caspase-8 and calpain appeared not to be required for IL-33 production by macrophages (Ohno, Oboki et al. 2009). Interestingly, other proteases such as neutrophil elastase and cathepsin G were recently shown to cleave IL-33 at different sites, resulting in bioactive IL-33₉₅₋₂₇₀, IL-33₉₉₋₂₇₀ and IL-33₁₀₉₋₂₇₀ (Lefrancais, Roga et al. 2012).

Exposure to HDM leads to the release of uric acid activating the NLRP3 inflammasome, but our data and recent report suggest a NLRP3 independent activation with increased bioactive IL-33 (Kool et al., 2011).

Furthermore IL-33 augments the release of uric acid, which activates Syk kinase in DC. Most striking we found increased pulmonary Syk expression upon HDM exposure in caspase 1 deficient mice suggesting that caspase-1 modulates the development of allergic asthma via enhanced IL-33 production with increased uric acid production signaling through Syk kinase.

We demonstrate here that the double absence of Casp-1 and 11 allows a massive inflammatory response with release of abundant IL-1 α , IL-1 β and other inflammatory mediators which augment the HDM driven Th2 response, with increased production of full length, but also more bioactive, cleaved IL-33 forms. The NLRP3/ASC inflammasome complex is involved, as HDM-induced Th2 inflammation and IL-33 activation are increased in NLRP3 deficient mice, similar to *Casp-1*^{-/-} mice.

Our previous findings using OVA induced allergic asthma model demonstrate that the NLRP3 inflammasome is an integral part of OVA induced allergic lung inflammation, absence of NLRP3 reducing OVA-induced response (Besnard, Guillou et al. 2011). It is important to note that there are major differences concerning the antigenicity between OVA and HDM allergens. While OVA does not cause allergy without prior immunization, HDM is allergenic by itself upon direct exposure. HDM is a mixture of

serine/cysteine proteases (Der p1, Der p9) and proteins without enzymatic activity (Der p2 and Der p7) which are highly allergenic (Gregory and Lloyd 2011). HDM antigens stimulate bronchial epithelial cells to produce TSLP, IL-25, IL-33 and GM-CSF which are known to prime allergic inflammation (Hammad, Chieppa et al. 2009; Hammad, Plantinga et al. 2010). Here we show increased HDM-induced response in the absence of NLRP3. This apparent discrepancy can be explained by the fact that HDM, but not OVA, induces IL-33 expression in macrophages, bronchial epithelial and possible other cells.

The amplifying role of IL-33 in the inflammatory response in the absence of NLRP3/ASC/Casp-1 is supported by the fact that IL-33 neutralization abrogates the exacerbated HDM induced allergic response seen in the absence of caspase-1/11.

In conclusion, IL-33 regulates HDM-induced allergic airway inflammation via NLRP3 inflammasome complex consisting of ASC and caspase-1 down regulating IL-33 production and the Th2 response. Importantly, HDM activation of casp-1 deficient macrophages produced more IL-33 establishing a direct link between casp-1 activation and IL-33 release. Alternative pathways associating cell injury, enhanced uric acid via Syk kinase activation may be critical for the amplification of lung inflammation in response to HDM.

METHODS

Mice

C57BL/6 wild-type mice, *Casp-1^{-/-}* (Kuida, Lippke et al. 1995), and *NLRP3^{-/-}* (generated directly on C57BL/6 background) (Martinon, Petrilli et al. 2006) mice were bred in our specific pathogen-free animal facility at CNRS, Orleans, France. Experiments were performed with gender-matched mice aged 8-10 weeks. All protocols were approved by the local ethics committee under the number (CLE CCO 2013-1004) and complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

HDM induced allergic airway inflammation induction

To induce HDM-driven eosinophilic airway inflammation, isoflurane anesthetized mice were administered intranasally twice at days 0 and 7 with 25 µg HDM extracts (ALK –Abello, Danemark) without adjuvant and were challenged on days 14-16 with 5 µg of HDM extracts. Control mice were challenged with saline alone. 24h after the last challenge, mice were sacrificed for bronchoalveolar lavage (BAL), EPO enzyme, uric acid, cytokines, chemokines, histology, qPCR and bronchial hyperreactivity.

Determination of bronchial hyperresponsiveness

For invasive measurement of dynamic resistance, mice were anesthetized with intraperitoneal injection of solution containing ketamine (100 mg/kg, Merial) and xylazine (10 mg/kg, Bayer), paralyzed using D-tubocurarine (0.125%, Sigma), and intubated with an 18-gauge catheter. Respiratory frequency was set at 140 breaths per min with a tidal volume of 0.2 ml and a positive end-expiratory pressure of 2 ml H₂O. Increasing concentrations of aerosolized methacholine (9.375, 18.75, 37.5, 75 and

150 mg/ml) were administered. Resistance was recorded with a *plethysmograph* (Buxco, London, UK). Baseline resistance was restored before administering the subsequent doses of methacholine.

Intranasal IL-33 administration

Mice were administered intranasally three times with 1µg of IL-33 recombinant protein (gift of J.P Girard, Institute of Pharmacology and structural biology, Toulouse, France), control mice received saline alone. Twenty four hours after the last challenge, mice were sacrificed, bronchoalveolar lavage (BAL) collected and cytokine, chemokine and uric acid were analyzed.

Administration of neutralizing murine ST2-Fc fusion protein.

HDM-treated mice were injected intraperitoneally with 150 µg of murine ST2-Fc fusion protein (mu ST2-Fc, Amgen, Seattle, USA) 30 min before HDM challenge. Twenty four hours after the last challenge and mu ST2-Fc fusion protein treatment, mice were sacrificed and different parameters analyzed.

Bronchoalveolar lavage (BAL)

BAL was performed by washing the lungs four times with 0.5 ml of saline solution at room temperature. After centrifugation at 400 x g for 10 min at 4°C, the supernatant (cell-free BAL fluid) was stored at -20°C for cytokine analysis.

Pulmonary eosinophil peroxidase (EPO) activity

EPO activity was determined in order to estimate the recruitment of eosinophil counts in lung parenchyma as described (Besnard, Guillou et al. 2011).

Lung histology

Lungs were fixed in 4% buffered formaldehyde and 3 µm sections were stained with periodic acid Schiff reagent (PAS) and examined with a Leica DM2500 microscope (x40 or x100 magnification). Peribronchial infiltrates and mucus hypersecretion were assessed by a semi-quantitative score (0-5) by two observers independently as described before (Besnard, Sabat et al. 2011).

Uric acid measurement

Uric acid concentration was determined in lung samples using an Amplex red uric acid/uricase assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR). Briefly, uricase catalyzes the conversion of uric acid to allantoin, hydrogen peroxide (H₂O₂), and carbon dioxide. In the presence of horseradish peroxidase, H₂O₂ reacts stoichiometrically with Amplex Red reagent to generate the red fluorescent oxidation product, resorufin, which is measured spectrophotometrically.

Cytokines measurement

IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, mIL-33, hIL-33, GM-CSF, TNFα, CCL5 (Rantes), CCL11 (Eotaxin), CCL17 (TARC), CCL20 (MIP-3α), CCL22 (MDC) and CCL24 (Eotaxin-2) concentrations in cell culture supernatant from mediastinal lymph nodes or lung homogenate were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, R&D, Abingdon, UK) or by Multiplex (BioRad) according to the manufacturer's recommendations.

Bone marrow derived macrophages

Murine bone marrow cells were isolated from femurs of WT and *Casp-1*^{-/-} mice and

differentiated into macrophages, 10^6 cells/ml were cultured for 10 days in DMEM (Sigma) supplemented with 20% horse serum (Gibco) and 30% L929 cell-conditioned medium as a source of M-CSF. After 7 days, cells were washed and re-cultured in fresh medium for another 3 days. The cell preparation contained a homogenous population of macrophages. For the experiment, the cells were resuspended in medium containing 0.2% FCS and plated in 48-well microtiter plates (at 10^6 cells/well), and stimulated upon adherence with HDM (10 μ g/ml, Stallergenes). Cell supernatants or cell lysates were harvested after 6h or 24 h and analyzed directly for cytokine quantification or stored frozen at -80°C .

BEAS-2B and THP1 cell line stimulation

BEAS-2B and THP1 cell lines were cultured at $2 \cdot 10^6$ cells/ml in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% FCS (Perbio), 1% Penicillin- Streptomycin (Gibco) and Hepes (Gibco). For the experiment, the cells were resuspended in medium containing 0.2% FCS and plated in 48-well plates (at $2 \cdot 10^6$ cells/well), and stimulated upon adherence with HDM (10 μ g/ml, Stallergenes). Cell supernatants or cell lysates were harvested after 6h and analyzed directly for cytokine quantification or stored frozen at -80°C .

Lung fibroblasts

Mice were sacrificed by CO_2 exposure and lungs were perfused with 10 ml of Isoton (Beckman Coulter). Lungs were excised and cut in small pieces and digested 45 min with DNase from bovine pancreas (0.5 mg/ml, Sigma) and collagenase type IV (1 mg/ml, Gibco). Digested lungs were crushed and passed through 100 μ m pore size filters (BD Bioscience, France). The cell suspension was washed and cultured in

DMEM medium (Sigma) supplemented with 10% FCS (Perbio), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) and 1% L-Glutamine (Gibco) in a T25 flask until confluent. Passage of adherent cells four times allowed macrophages and monocytes contaminants removal. The resulting fibroblasts were digested 5 min with Trypsin-EDTA (Gibco) and plated in 24 well plates (10^4 cells/well) until they reached 90 % confluence.

Muc5ac and IL-33 mRNA expression

Total RNA was isolated from homogenized mouse lung using Tri Reagent (Sigma) and quantified by NanoDrop (Nd-1000). Reverse transcription was performed with SuperScript III Kit according to manufacturers' instructions (Invitrogen). cDNA was subjected to quantitative PCR using primers for Muc5ac (*sense* 5'CAGCCGAGAGGAGGGTTTGATCT and *anti-sense* 5'AGTCTCTCTCCGCTCCTCTCA; Sigma) or IL-33 (Qiagen QT00135170). Relative transcript expression of a gene is given as $2^{-\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = C_{t\text{target}} - C_{t\text{reference}}$), relative changes compared with control are $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{treated}} - \Delta C_{t\text{control}}$) (John, Kohse et al. 2014).

Immunoblotting

Lung tissues were homogenated in Tris-HCl 0,05M pH8 with Polytron PT 2100 (Kinematica AG). Protein concentration was determined using the Bradford method (Bio-Rad). Equal amounts of protein (30 µg/sample) were denaturated by boiling (95°C, 5min), separated by SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare). The membrane was blocked in Tris-buffer saline (TBS), tween 20, containing 10% lipid free dry milk. Antibodies used for detection were diluted in Tris-

buffer saline, tween 20, containing 5% (TBST) lipid free dry milk and were from Sigma unless otherwise stated.

The control β -Actin was detected with primary mouse anti β -Actin antibody followed by biotinylated secondary goat anti-mouse Ig and extravidine peroxidase. IL-33 was detected with primary goat anti-IL-33 biotinylated antibody (R&D Systems) followed by a secondary antibody HRP conjugated rabbit anti-goat Ig. Caspase-1 (p20) is detected with primary mouse anti caspase-1 (p20) monoclonal antibody (Adipogen) followed by biotinylated secondary goat anti-mouse and extravidine peroxidase. IL-1 β and Syk were detected with primary anti-mouse IL-1 β and syk followed by a secondary antibody HRP conjugated rabbit anti-goat Ig and anti-rabbit HRP Ig (Cell signaling) respectively. Immuno-reactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare).

Statistical analysis

To determine whether the data come from Gaussian distribution, column statistic using D'Agostino and Pearson test is performed before running the statistical analysis. Statistical evaluation of differences between the experimental groups were determined by using parametric (one-way Anova followed by a Bonferroni post test) and non parametric (Kruskal Wallis followed by Dunns multiple comparison post test) test according to the results of column statistic. All tests were performed with Graphpad Prism, Version 4.03 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego California USA, www.graphpad.com). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistically significant differences were defined as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$).

Acknowledgments

We thank N. Froux, S. Rose and F. Savigny for technical support and help with animal experiments, JP Girard for providing recombinant IL-33 and Dr F. Erard and Dr M. Le Bert for discussions and critical reading of the manuscript.

Declaration of all sources of funding

This work was support by University of Orleans, la Région Centre (HabitAsthme N° 2012 00073535) and Conseil Général 45 to F.Madouri PhD fellowship. Murine ST2-Fc fusion protein (muST2-Fc) was obtained from Dr Kristi Palmer and Dr Dirk Smith from Amgen, Seattle, USA. Recombinant IL-33 was a gift from Dr Jean-Philippe Girard, Institute of Pharmacology and structural biology, Toulouse, France. House dust mite extracts were obtained from Dr Laurent Mascarell from Stallergenes, Antony, France and Carolina Rask, ALK Abello, Horsholm, Denmark.

References

- Besnard, A.G., Guillou, N., Tschopp, J., et al. (2011a). NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy* 66, 1047-1057.
- Besnard, A.G., Sabat, R., Dumoutier, L., et al. (2011b). Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med* 183, 1153-1163.
- Broz, P., Newton, K., Lamkanfi, M., et al. (2010). Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *J Exp Med* 207, 1745-1755.
- Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., et al. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 282-287.
- Cayrol, C., and Girard, J.P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9021-9026.
- Chen, C.J., Kono, H., Golenbock, D., et al. (2007). Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 13, 851-856.
- Coyle, A.J., Lloyd, C., Tian, J., et al. (1999). Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J Exp Med* 190, 895-902.
- Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., et al. (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453, 1122-1126.

- Finkelman, F.D., and Urban, J.F., Jr. (2001). The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 107, 772-780.
- Franchi, L., Kamada, N., Nakamura, Y., et al. (2012). NLR4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nat Immunol* 13, 449-456.
- Gregory, L.G., and Lloyd, C.M. (2011). Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends in Immunology* 32, 402-411.
- Gudbjartsson, D.F., Bjornsdottir, U.S., Halapi, E., et al. (2009). Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet* 41, 342-347.
- Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., et al. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15, 410-416.
- Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., et al. (2010). Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 207, 2097-2111.
- Haraldsen, G., Balogh, J., Pollheimer, J., et al. (2009). Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol* 30, 227-233.
- Jacquet, A. (2013). Innate immune responses in house dust mite allergy. *ISRN Allergy* 2013, 735031.
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., et al. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479, 117-121.
- Kearley, J., Buckland, K.F., Mathie, S.A., et al. (2009). Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 772-781.

- Kool, M., Willart, Monique A.M., van Nimwegen, M., et al. (2011). An Unexpected Role for Uric Acid as an Inducer of T Helper 2 Cell Immunity to Inhaled Antigens and Inflammatory Mediator of Allergic Asthma. *Immunity* 34, 527-540.
- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., et al. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267, 2000-2003.
- Kuroda, E., Ishii, K.J., Uematsu, S., et al. (2011). Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity* 34, 514-526.
- Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., et al. (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 183, 6469-6477.
- Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2012). The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 18, 684-692.
- Lefrancais, E., and Cayrol, C. (2012). Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw* 23, 120-127.
- Lefrancais, E., Roga, S., Gautier, V., et al. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1673-1678.
- Liew, F.Y., Pitman, N.I., and McInnes, I.B. (2010). Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 10, 103-110.
- Lukens, J.R., Gross, J.M., and Kanneganti, T.D. (2012). IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front Immunol* 3, 315.

- Luthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., et al. (2009). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31, 84-98.
- Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27, 229-265.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., et al. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237-241.
- Moffatt, M.F., Gut, I.G., Demenais, F., et al. (2010). A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 363, 1211-1221.
- Moussion, C., Ortega, N., and Girard, J.P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 3, e3331.
- Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., et al. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464, 1367-1370.
- Nile, C.J., Barksby, E., Jitprasertwong, P., et al. (2010). Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology* 130, 172-180.
- Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., et al. (2010). IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18581-18586.
- Ohno, T., Oboki, K., Kajiwara, N., et al. (2009). Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. *J Immunol* 183, 7890-7897.
- Palmer, G., and Gabay, C. (2011). Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 7, 321-329.
- Palmer, G., Lipsky, B.P., Smithgall, M.D., et al. (2008). The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. *Cytokine* 42, 358-364.

- Pastorelli, L., Garg, R.R., Hoang, S.B., et al. (2010). Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8017-8022.
- Prefontaine, D., Lajoie-Kadoch, S., Foley, S., et al. (2009). Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* 183, 5094-5103.
- Prefontaine, D., Nadigel, J., Chouiali, F., et al. (2010). Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125, 752-754.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479-490.
- Shimosato, T., Fujimoto, M., Tohno, M., et al. (2010). CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 81-86.
- Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Yoon, B.R., et al. (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* 20, 1019-1030.
- Townsend, M.J., Fallon, P.G., Matthews, D.J., et al. (2000). T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 191, 1069-1076.
- Willart, M.A., Deswarte, K., Pouliot, P., et al. (2012). Interleukin-1alpha controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J Exp Med* 209, 1505-1517.
- Zhao, W., and Hu, Z. (2010). The enigmatic processing and secretion of interleukin-33. *Cell Mol Immunol* 7, 260-262.

Figures

Figure 1

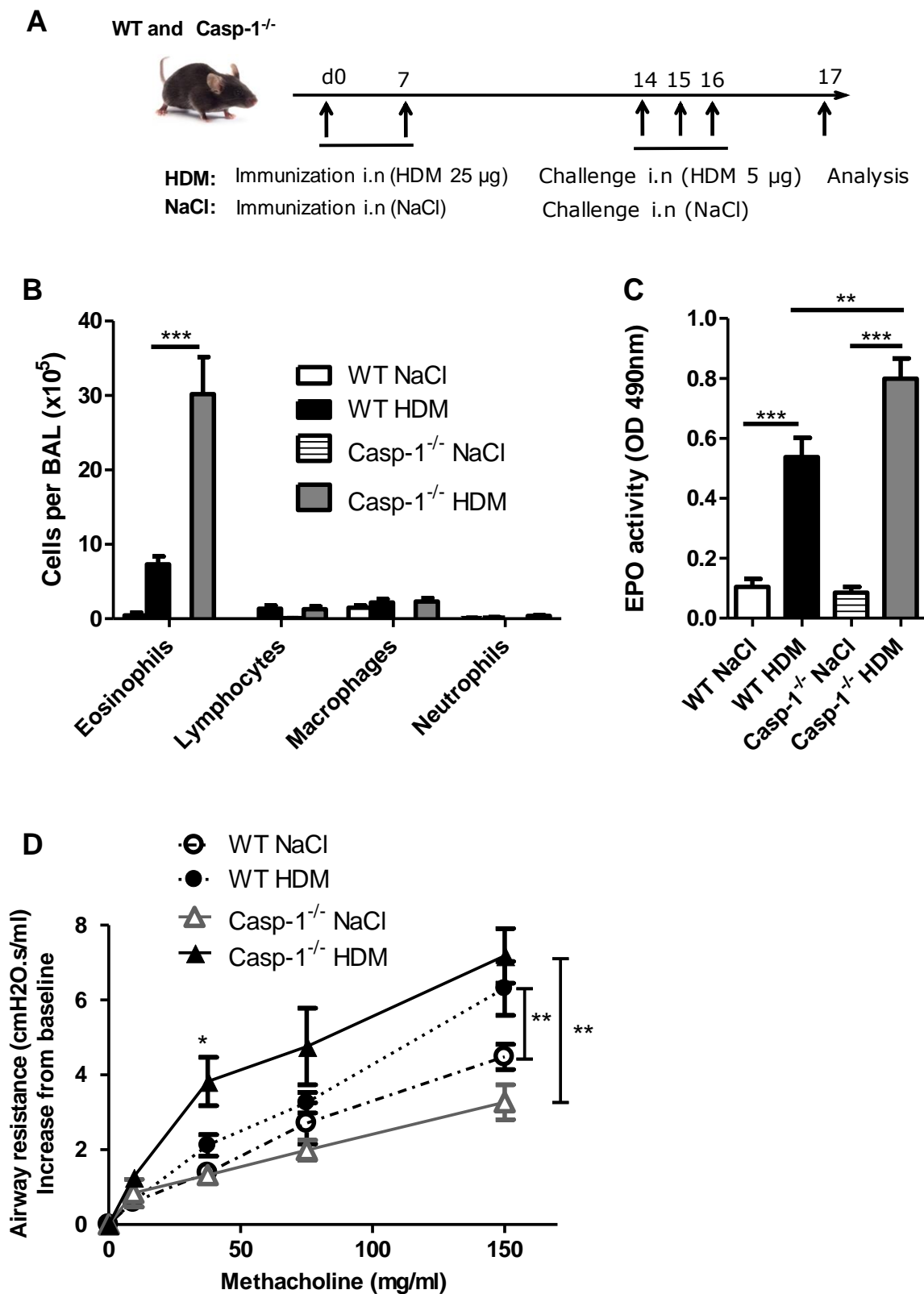


Figure 1

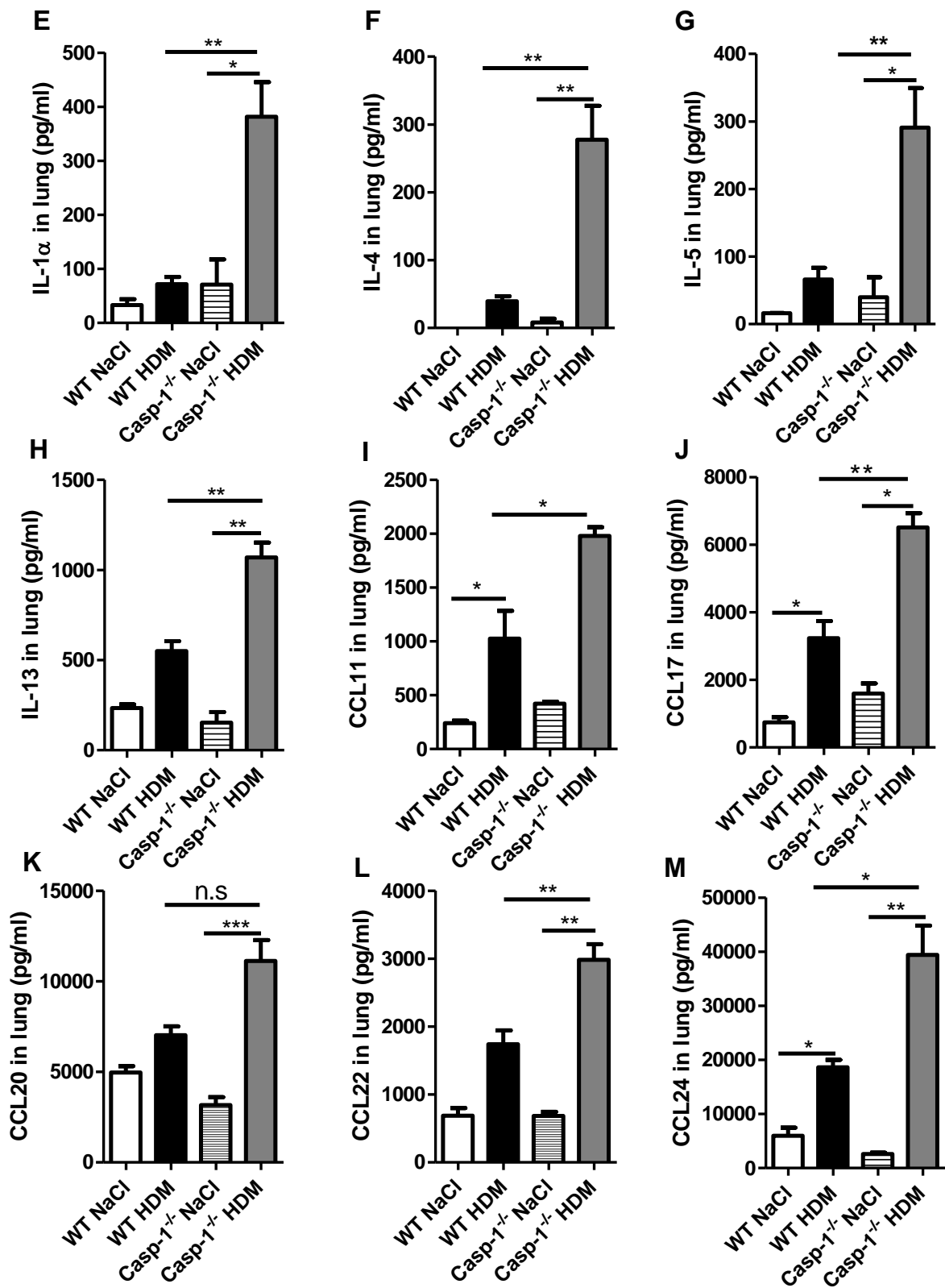


Figure 2

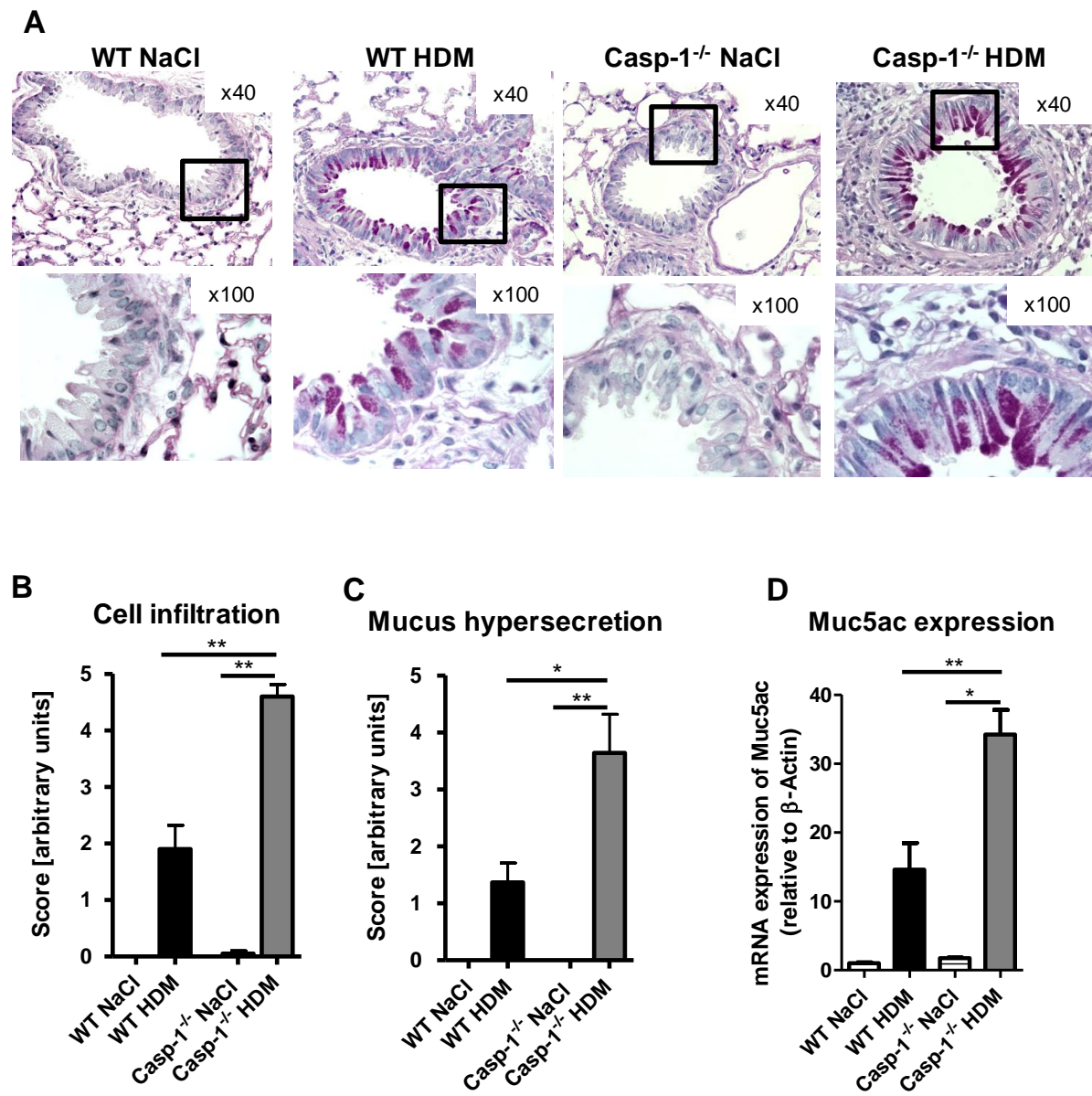
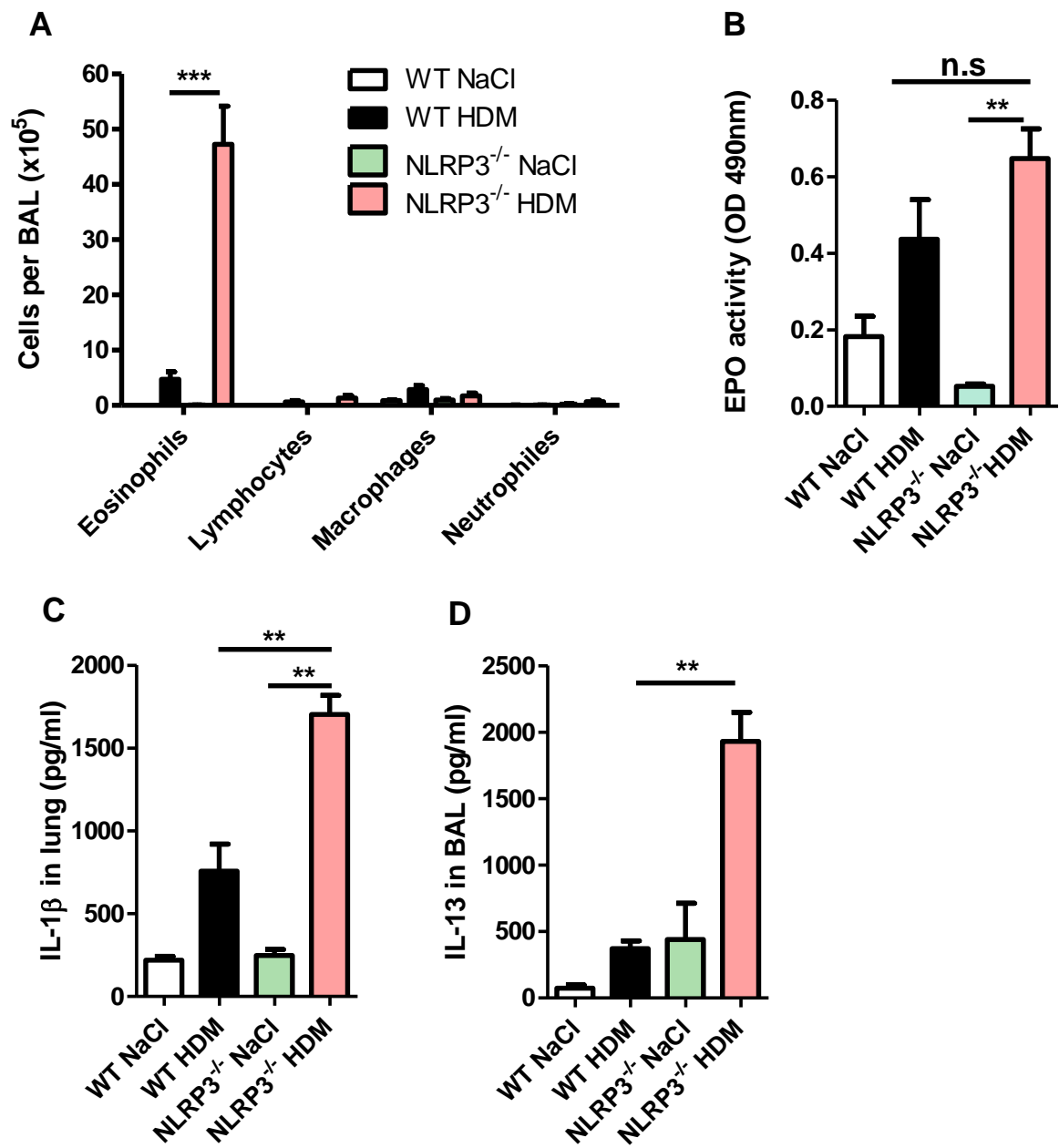


Figure 3



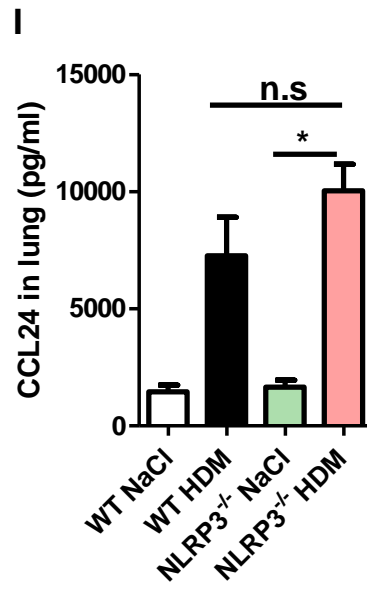
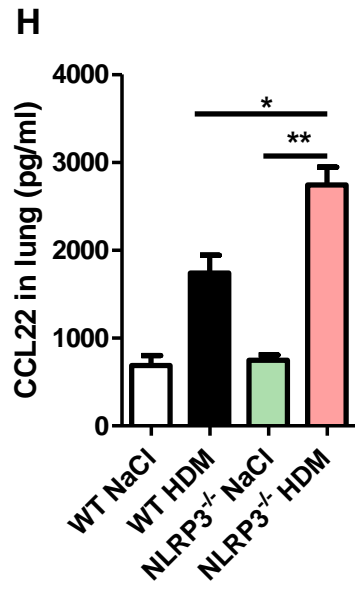
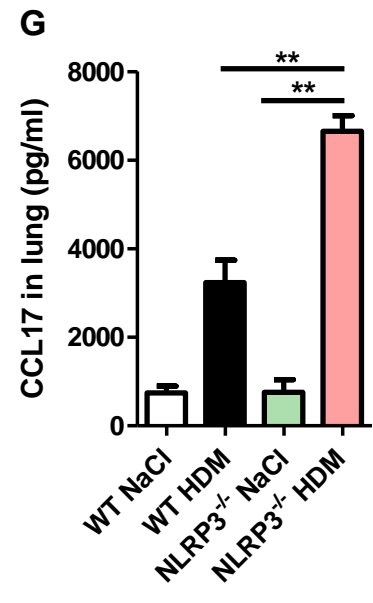
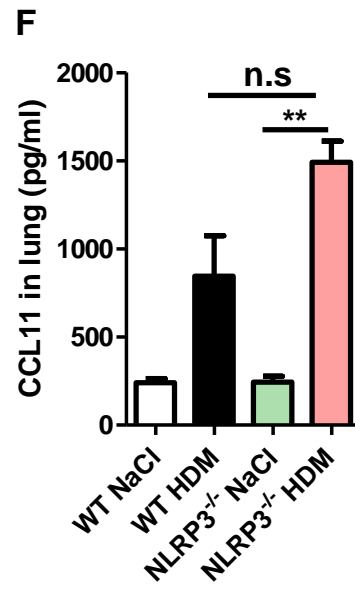
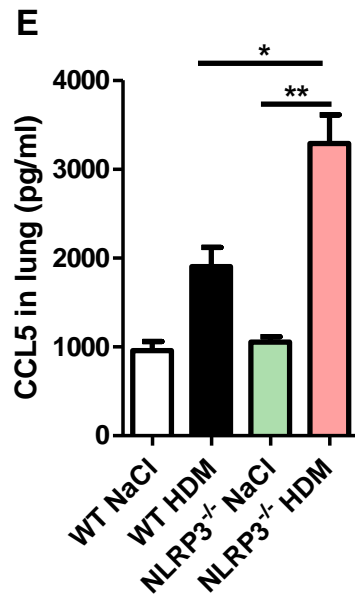
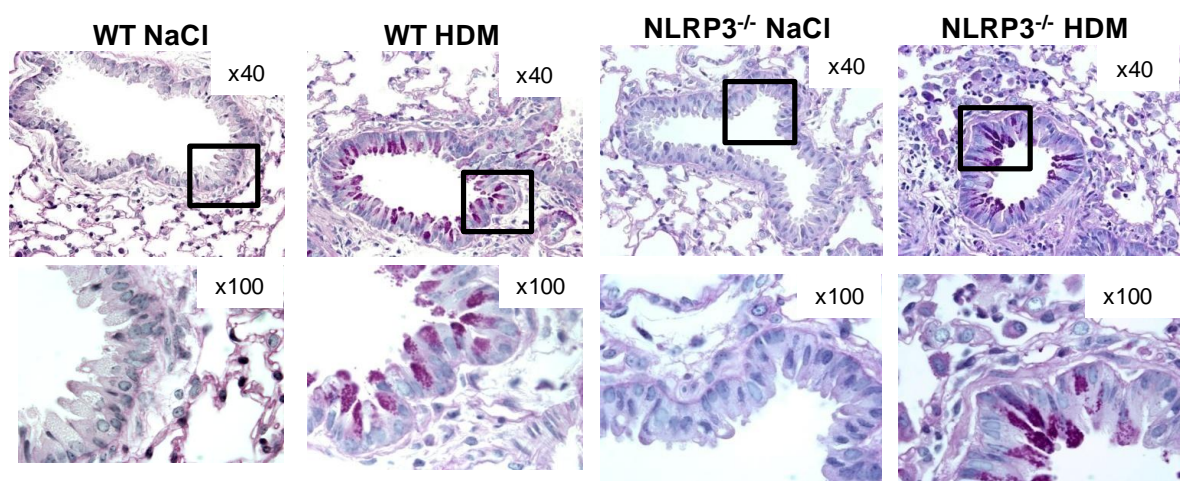
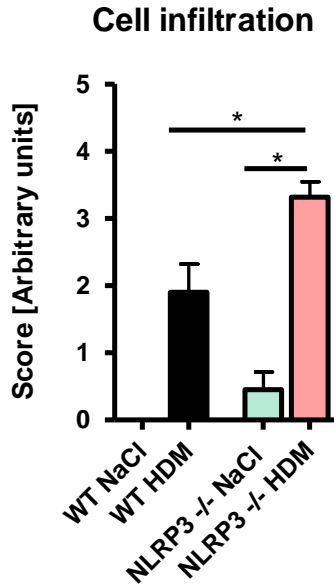


Figure 3

J



K



L

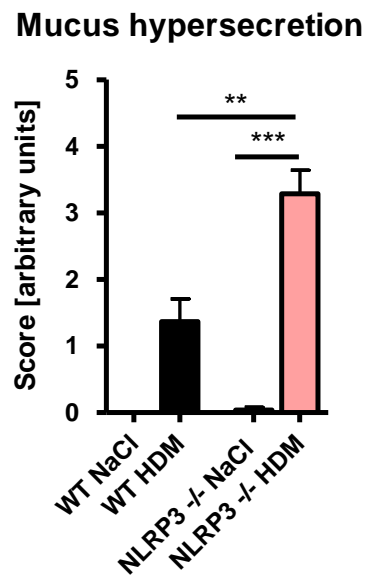


Figure 4

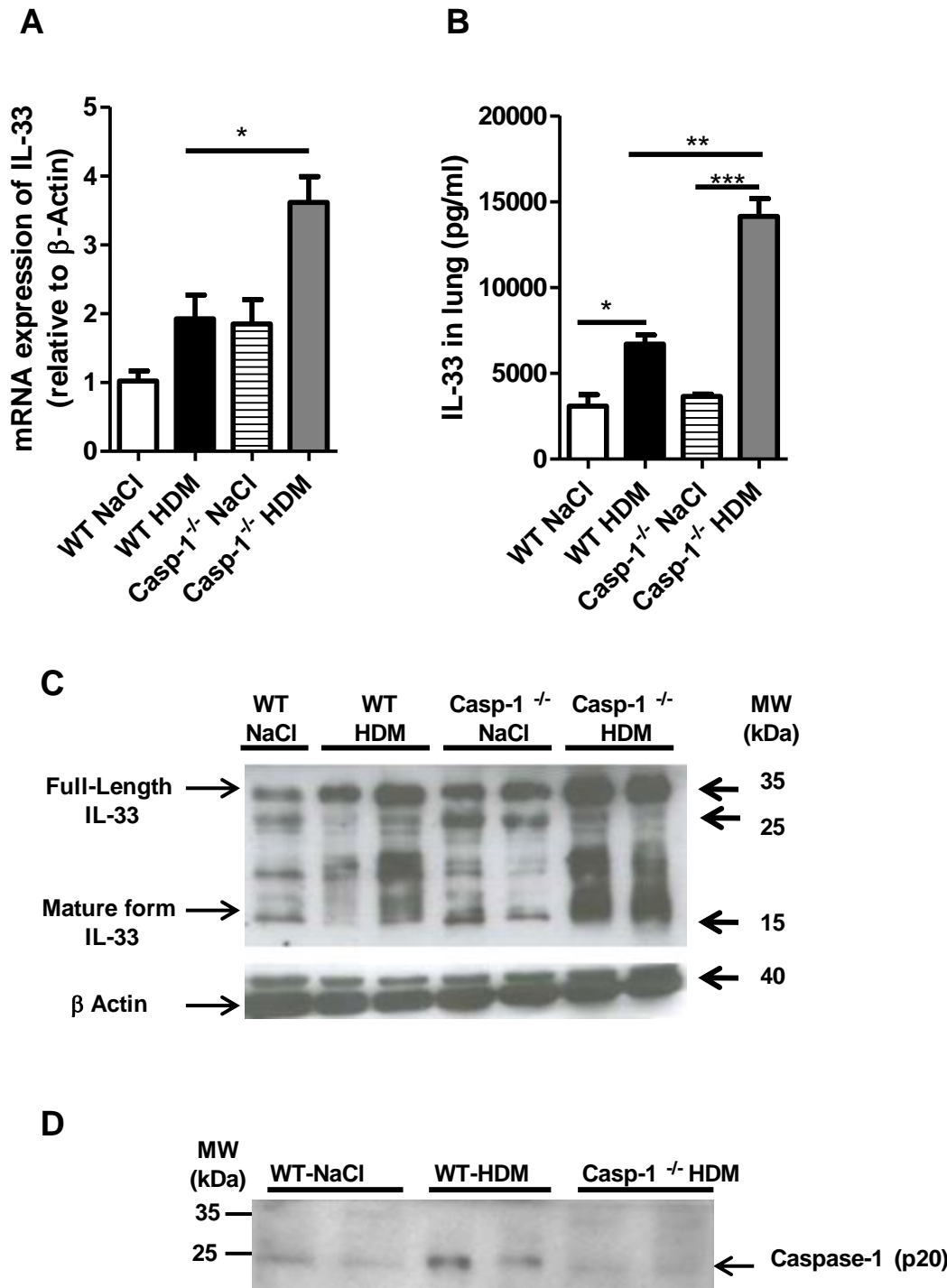


Figure 4

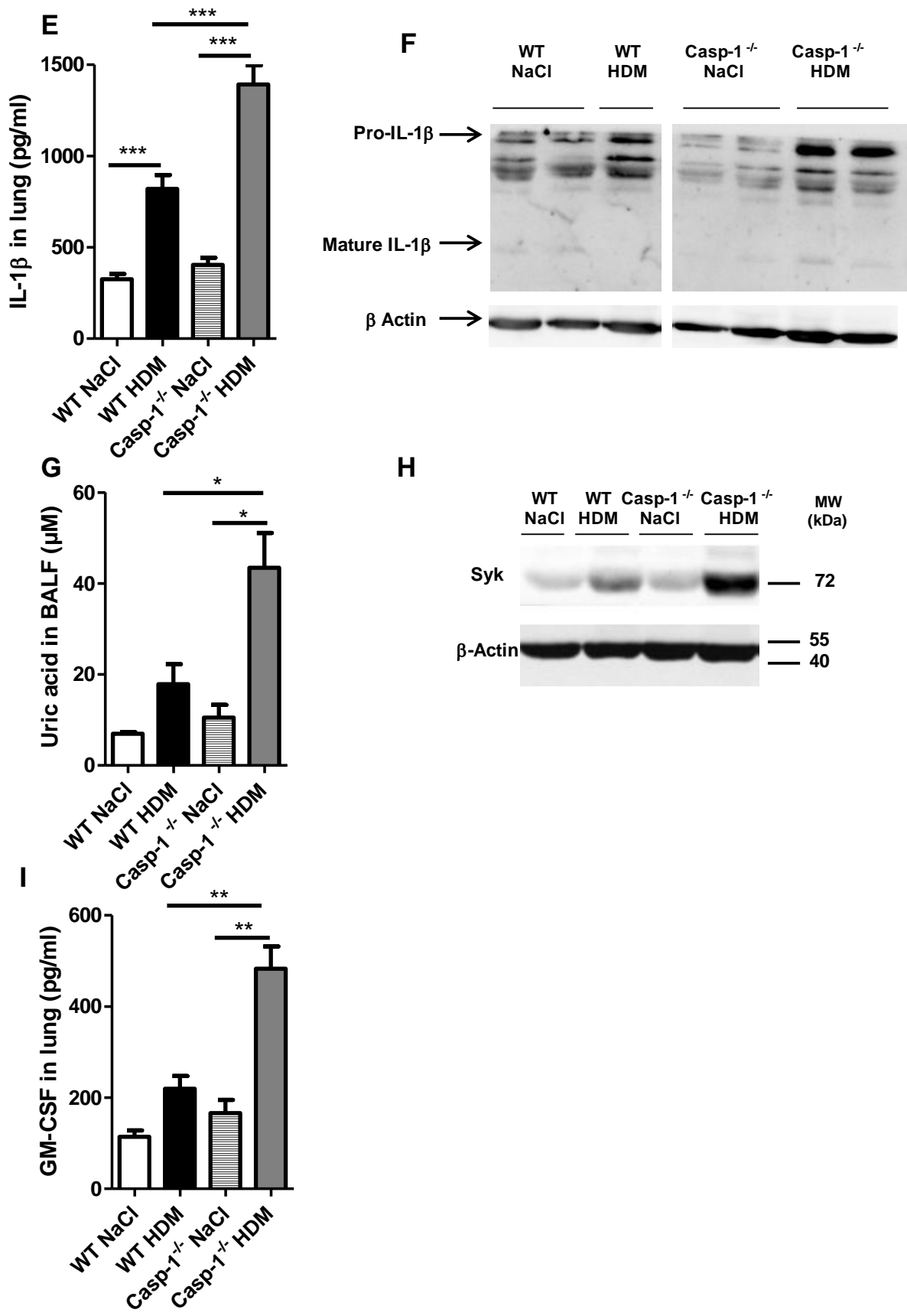
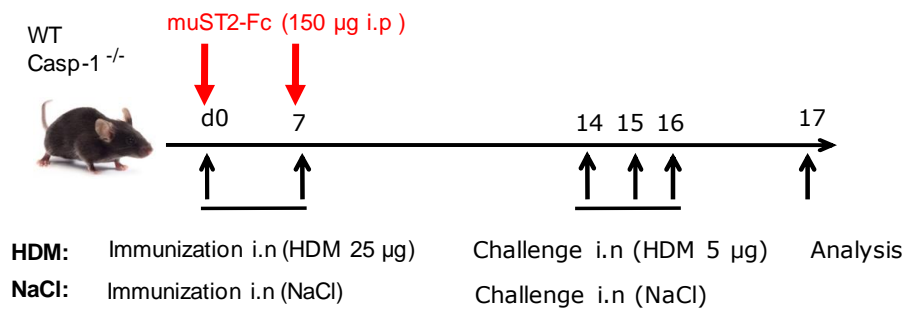
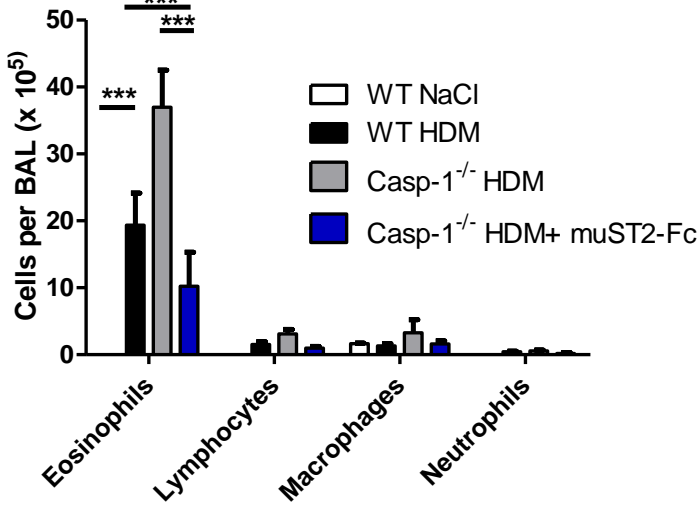


Figure 5

A



B



C

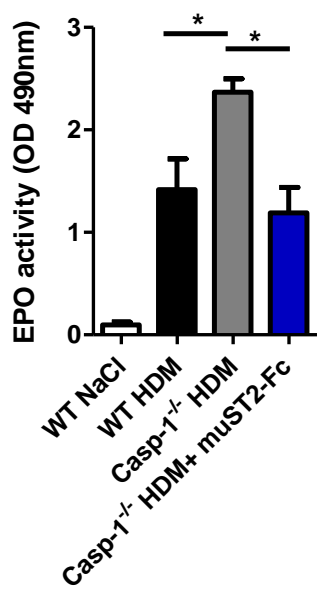


Figure 5

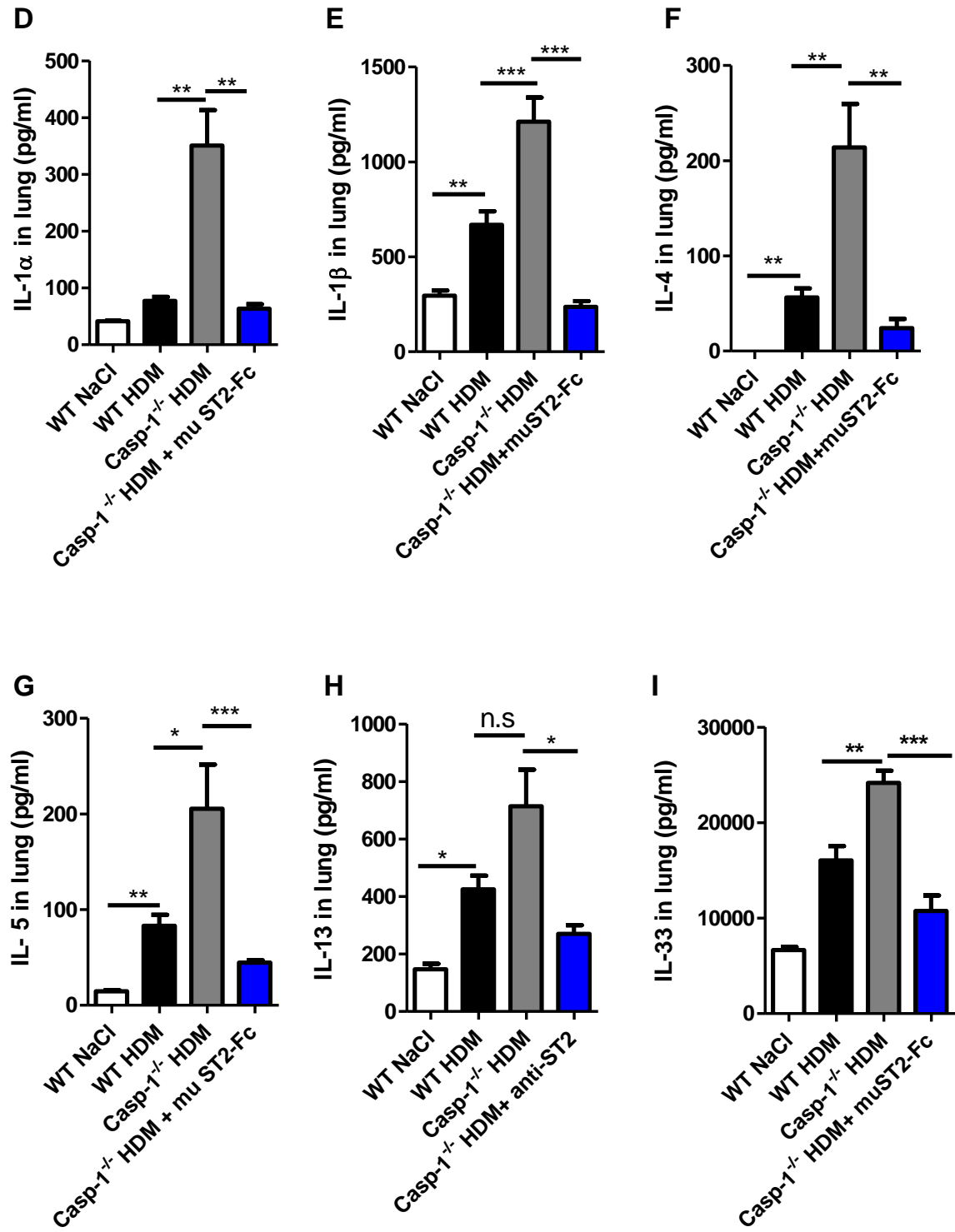


Figure 5

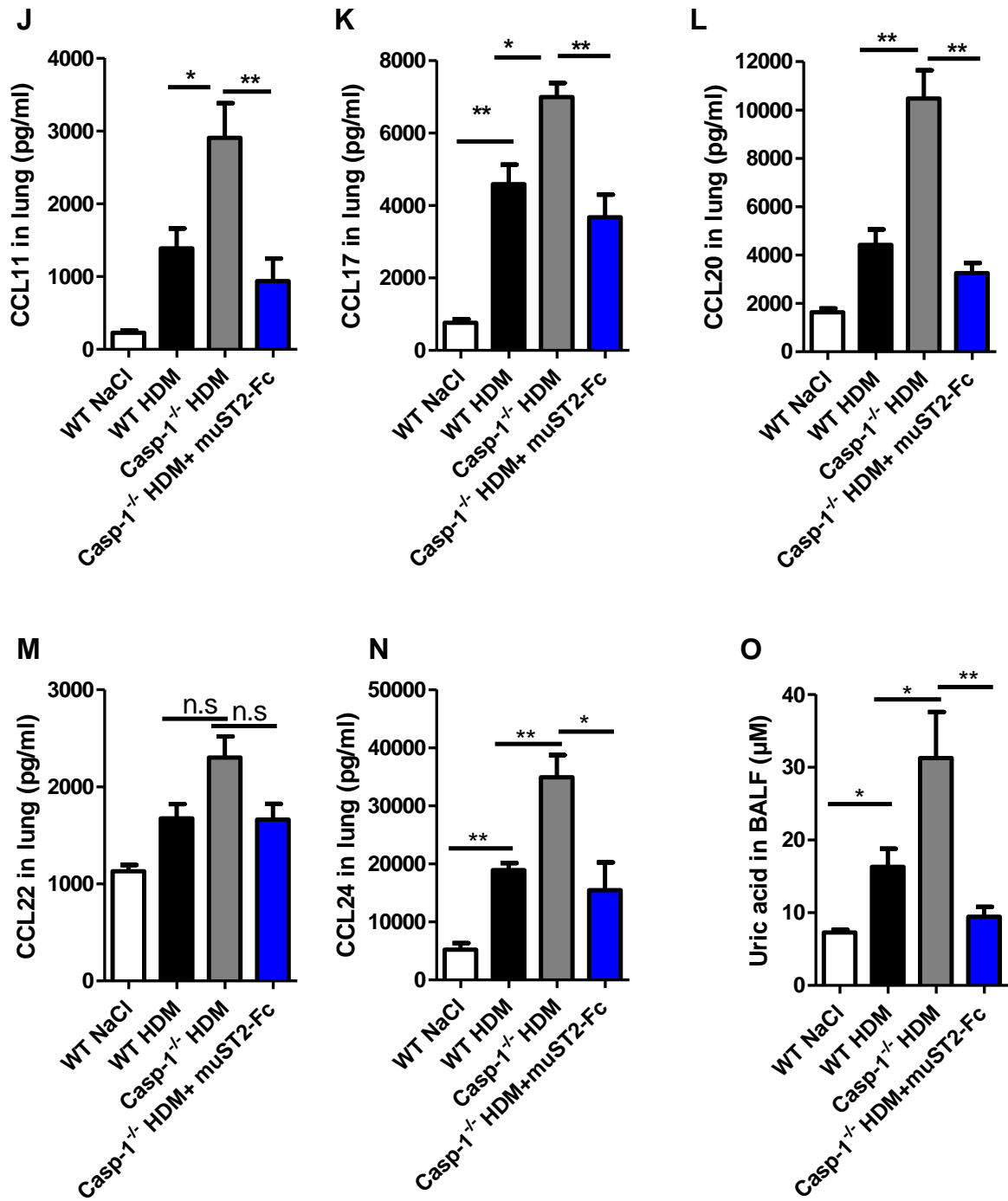


Figure 5

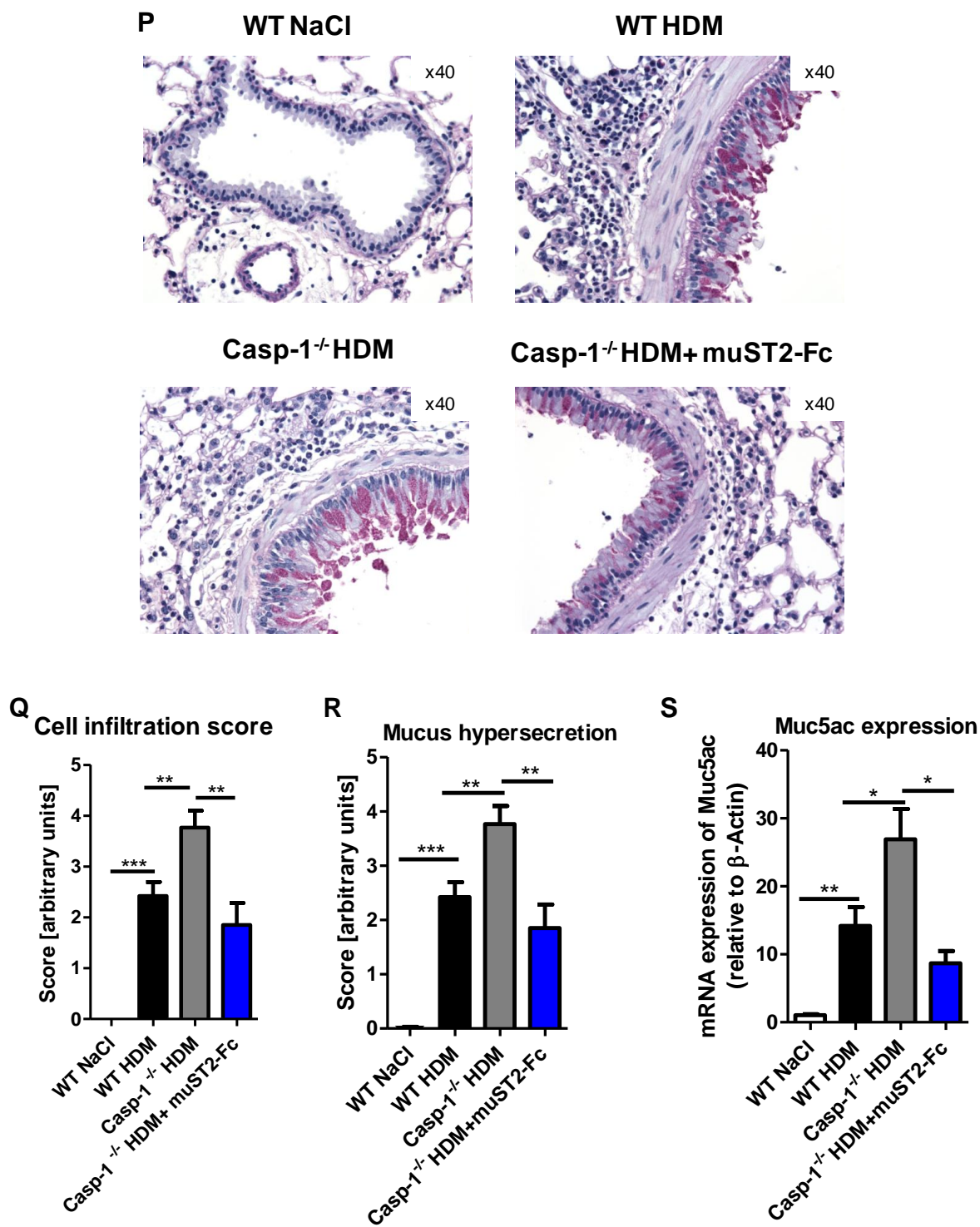


Figure 6

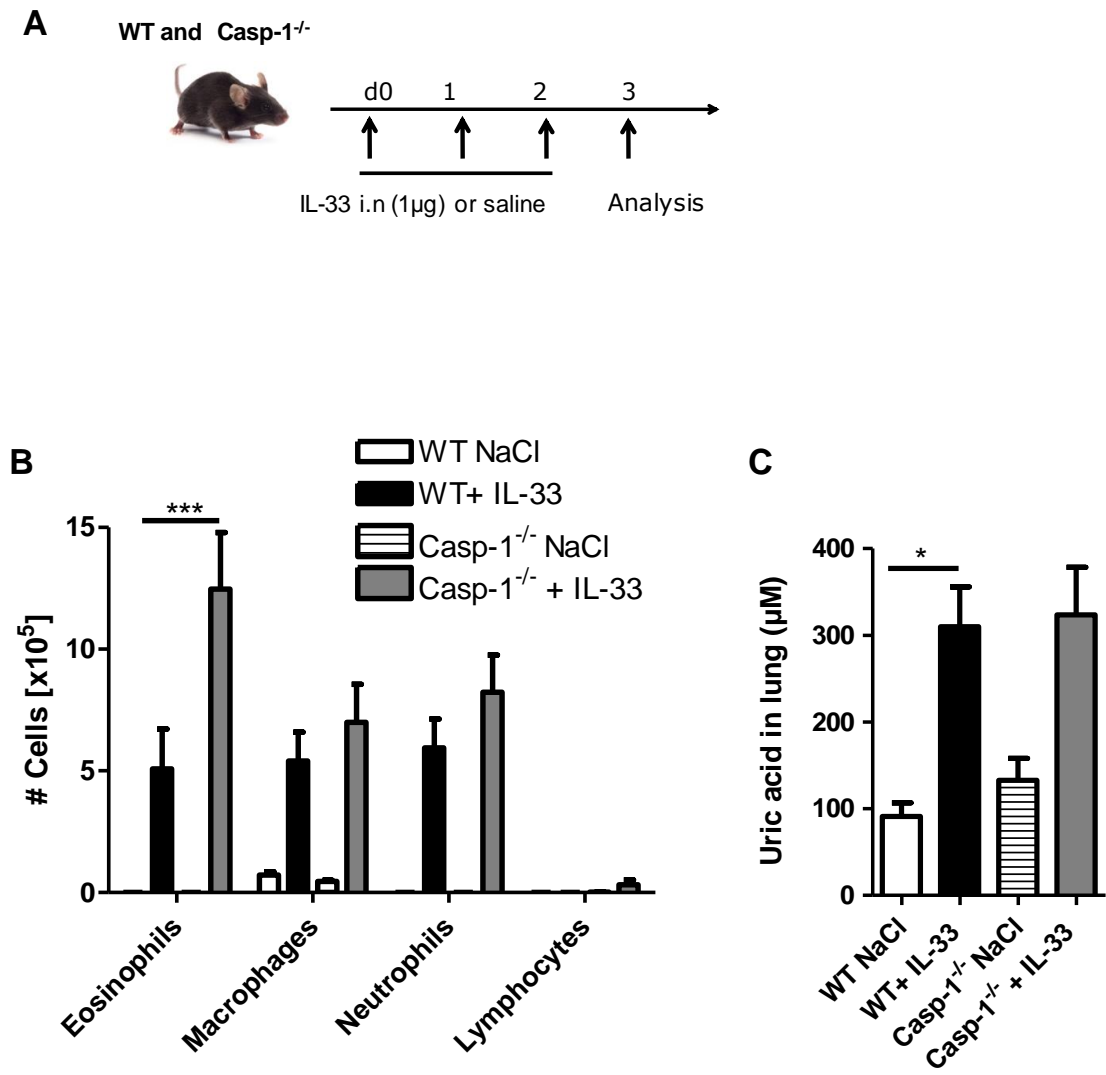


Figure 7

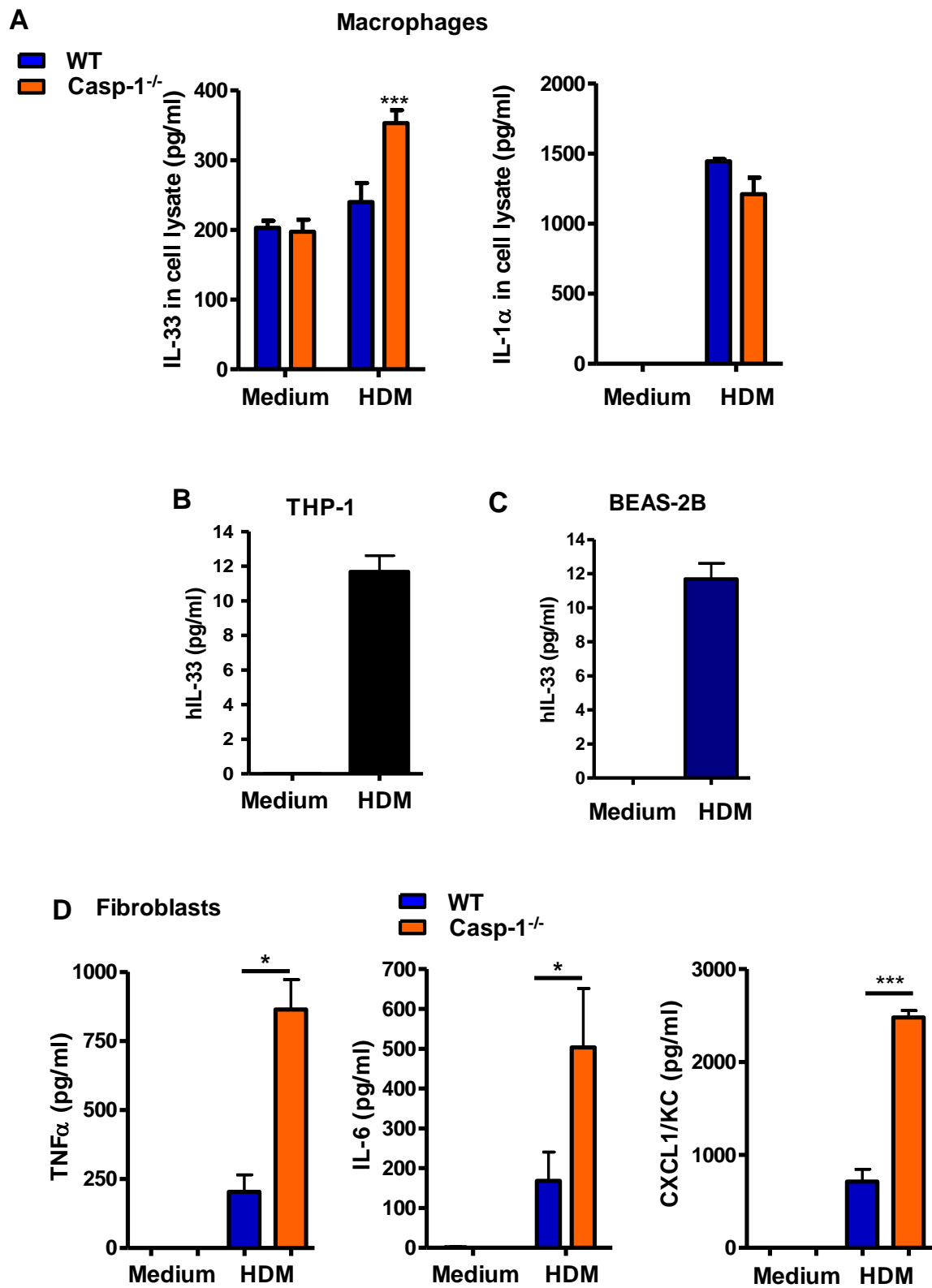


Figure legends

Figure 1. *Caspase-1*-deficient mice show increased airway inflammation in experimental HDM model.

HDM sensitized WT and *Casp-1*^{-/-} mice were challenged three times with HDM extract as indicated (A). The numbers of eosinophils, lymphocytes, macrophages and neutrophils were determined in bronchoalveolar lavage (BAL) 24h after the last HDM exposure (B). The eosinophil peroxidase activity (EPO; C) was measured in lung homogenates. Airway hyper-responsiveness to increasing doses of methacholine (Mch; 9.375-150 mg/ml) was measured 24 hours after the last HDM challenge on WT and *Casp-1*^{-/-} mice by recording changes in lung resistance (D). The concentrations of IL-1 α , IL-4, IL-5, IL-13 (E-H), CCL11, CCL17, CCL20, CCL22 and CCL24 (I-M) were measured in lung homogenates by ELISA and Multiplex assay. Results are expressed as mean \pm SEM of 8 mice per group and are from one experiment representative of two similar independent experiments. *P \leq 0.05; **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001; ns, not significant.

Figure 2. Exacerbated lung inflammation and mucus hypersecretion in *caspase-1*-deficient mice exposed to HDM.

Formalin-fixed lung sections were stained with periodic acid Schiff reagent (PAS) to visualize mucus (A). Representative sections from saline control and HDM treated WT and *Casp-1*^{-/-} mice are shown. Magnifications are x 40 and x100 as indicated. A semi-quantitative histological assessment of inflammatory cell infiltration (B) and mucus hypersecretion (C) was performed by two independent observers. A scale from 0 to 5 is given on the axis. Muc5ac mRNA expression was measured by

quantitative-PCR (D). These experiments were performed twice (n = 8 mice per group). Results are expressed as mean \pm SEM of 8 mice per group and are from one experiment representative of two similar independent experiments. *P \leq 0.05; **P \leq 0.01

Figure 3. Increased allergic airway inflammation in *NLRP3*^{-/-} deficient mice exposed to HDM.

HDM sensitized WT and *NLRP3*^{-/-} mice were challenged three times with HDM extracts as shown in Figure 1A. 24 hours after the third challenge, eosinophil, lymphocyte, neutrophil and macrophage counts were determined in BAL fluid (A). EPO activity was evaluated (B) and IL-1 β , IL-13 (C-D), CCL5, CCL11, CCL17, CCL22 and CCL24 (E-I) were measured in lung homogenates by ELISA. Histological sections of lungs from WT and *NLRP3*^{-/-} mice were stained for PAS (J). Magnifications are x 40 and x100 as indicated. A semi-quantitative histological score of cell infiltration (K) and mucus hyper secretion (L) was performed by two independent observers. A scale from 0 to 5 is given on the axis. Data are presented as mean \pm SEM and are representative of three independent experiments (n=8 mice per group). *P \leq 0.05; **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001.

Figure 4. Increased pulmonary IL-33 levels upon HDM exposure in *caspase-1* deficient mice.

IL-33 mRNA expression was measured by Q-PCR (A). The total concentration and molecular length of IL-33 (B and C), IL-1 β (E, F) and caspase-1 p20 subunit (D), were determined in lung supernatant 24h after the last HDM exposure by ELISA (B and E) or Western blot analysis (C, F). Full-length IL-33 (34 kDa) and mature form

(18 kDa) of IL-33 are differentiated by Western blot analysis in lung supernatant of HDM treated WT and *Casp-1*^{-/-} mice or saline control mice (C). Caspase-1 p20 subunit is determined in lung supernatant of WT and *Casp-1*^{-/-} mice treated or saline control (D). Pro-IL-1 β (35 kDa) and mature form (15 kDa) are differentiated by Western blot analysis in lung supernatant of HDM treated WT and *Casp-1*^{-/-} mice or saline control mice (F). Uric acid was measured in BALF (G), total Syk protein was determined by western blot in lung supernatant of WT and *Casp-1*^{-/-} mice treated or saline control (H) and GM-CSF cytokine production was measured by ELISA in lung of mice (I). β actin is quantified in all Western blot experiments to determine the quantity of sample per well. Results are expressed as mean \pm SEM of 8 mice per group and are from one experiment representative of two similar independent experiments. *P \leq 0.05; **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001.

Figure 5. Blockade of IL-33 with murine ST2-Fc fusion protein during sensitization phase reduces airways eosinophilia and inflammation in *caspase-1* deficient mice.

WT or *Casp-1*^{-/-} mice were sensitized with HDM (25 μ g on day 0 and 7) with or without ST2-Fc fusion protein (150 μ g by i.p. injection), and were challenged 3 times with HDM instillation (5 μ g on days 14, 15 and 16) (A). 24h after the third challenge, eosinophil numbers and EPO activity were determined in the BAL fluid (B) and in the lung (C). IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-13, IL-33 (D-I), CCL11, CCL17, CCL20, CCL22 and CCL24 (J-N) were measured by ELISA in the lung homogenates. Uric acid production was measured in BALF (O). Histological sections of lungs from WT and *Casp-1*^{-/-} mice were stained for PAS (P). Magnifications are x40 as indicated. A semi-quantitative histological score of cell infiltration (Q) and mucus hyper secretion (R)

was performed by two independent observers. A scale from 0 to 5 is given on the axis. Muc5ac mRNA expression was measured by Q-PCR (S). Results are expressed as mean \pm SEM of 8 mice per group and are from one experiment representative of two similar independent experiments. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 6. Intranasal administration of recombinant IL-33 Increased airway inflammation in *Casp-1^{-/-}* mice.

WT or *Casp-1^{-/-}* mice were treated with three intranasal instillations of 1 μ g of IL-33 (A). 24h after the last treatment eosinophil, macrophage, neutrophil and lymphocyte recruitment were determined in BALF (B). Uric acid concentration was determined in lung homogenate (C). Results are expressed as mean \pm SEM of 8 mice per group and are from one experiment representative of two similar independent experiments. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$. ns, not significant.

Figure 7. Increased IL-33 production in *caspase-1* deficient macrophages *in vitro*

Macrophages from wild type and *Casp-1^{-/-}* mice were stimulated for 6 h with HDM (10 μ g/ml) and the cell lysate was analyzed for IL-33 and IL-1 α by ELISA (A). THP-1 and BEAS-2B cell lines were stimulated for 6 h with HDM (10 μ g/ml) and hIL-33 level in cell lysate was determined by ELISA (B and C).

Fibroblasts from wild type and *Casp-1^{-/-}* mice were stimulated for 24 h with HDM (10 μ g/ml) and TNF- α , IL-6 and KC (CXCL1) levels in the supernatant were quantified by ELISA (D). Data are means \pm SEM from $n = 4$ are from one experiment representative of two similar independent experiments. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; unpaired *t*-test.

Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33 dependent house dust mite induced allergic lung inflammation

Fahima Madouri^{1,2} , Noëlline Guillou¹ , Louis Fauconnier² , Tiffany Marchiol² , Nathalie Rouxel² , Pauline Chenuet¹ , Aurélie Ledru² , Lionel Apetoh^{3,4,5} , François Ghiringhelli^{3,4,5} , Mathias Chamaillard⁶ , Song Guo Zheng⁷ , Fabrice Trovero² , Valérie F.J. Quesniaux¹ , Bernhard Ryffel^{1,*} and Dieudonné Togbe^{1,2,*} .

SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUPPLEMENTAL METHODS

Mice

C57BL/6 wild-type mice, $ASC^{-/-}$ (backcross 12) and $NLRC4^{-/-}$ (backcross 10) (Mariathasan, Newton et al. 2004) mice were bred in our specific pathogen-free animal facility at CNRS, Orleans, France. Mice were maintained in a temperature-controlled (23°C) facility with a strict 12 h light/dark cycle and were given free access to food and water. Experiments were performed with gender-matched mice aged 8-10 weeks. All protocols were approved by the local institutional animal research ethical committee under the number (CLE CCO 2013-1004) and complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

Reagents

O-phenylenediamine, 3-amino-1,2,4-triazole, horseradish peroxidase, BSA grade V, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), ionomycin and Lipopolysaccharides (LPS (from *Escherichia coli*, serotype 0055B5) were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Recombinant Der p2 was purchased from Indoor Biotechnologies, UK. Propidium iodide and Annexin V staining kit was purchased from BD Pharmingen.

Lung mononuclear cells isolation and stimulation

Lung mononuclear cells were isolated from mice 24 h after the last challenge as described previously (Besnard, Guillou et al. 2011). Isolated lung mononuclear single cells were plated in round-bottom 96-well plates ($2 \cdot 10^6$ cells/well) and restimulated 4 h *in vitro* with phorbol 12-myristate 13-acetate (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml).

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1. Increased allergic airway inflammation in *ASC^{-/-}* deficient mice exposed to HDM.

HDM sensitized WT and *ASC^{-/-}* mice were challenged three times with HDM extracts as indicated Figure 1A. 24 hours after the third challenge, eosinophils, lymphocytes, neutrophils and macrophages were determined in BAL fluid (A). Eosinophil Peroxydase activity (EPO) is evaluated (B) and IL-1 β , IL-13, IL-33, CCL5, CCL11, CCL17, CCL22 and CCL24 (C-J) in lung homogenates were measured by ELISA. Histological sections of lungs from WT and *ASC^{-/-}* mice were stained for PAS (K). Magnifications are x 40 and x100 as indicated. A semi-quantitative histological score of inflammatory cell infiltration (L) and mucus hyper secretion (M) was performed by two independent observers. A scale from 0 to 5 is given on the axis. Results are expressed as mean \pm SEM of 8 mice per group and are from one experiment representative of two similar independent experiments. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; ns, not significant.

Figure S2. Increased allergic airway inflammation is NLRC4 independent.

HDM sensitized WT and *NLRC4^{-/-}* mice were challenged three times with HDM extract as indicated Figure 1A. 24 hours after the third challenge, eosinophils, lymphocytes, neutrophils and macrophages count were determined in BAL fluid (A). EPO activity was evaluated (B) and IL-1 β , IL-33, CCL11, CCL17, CCL22 and CCL24 (C) in lung homogenates were measured by ELISA. Histological sections of lungs from WT and *NLRC4^{-/-}* mice were stained for PAS (D). Data are presented as mean \pm SEM and are representative of three independent experiments (n=8 mice per group). * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$; ns, not significant.

Figure S3: HDM activates macrophages and dendritic cells to release IL-1 β and TNF *in vitro*.

Bone marrow derived macrophages (A,B) and dendritic cells (C,D) from WT or *Casp-1*-deficient mice were cultured 6 hours with medium or HDM extracts (10 μ g/ml) or recombinant Der p2 (1 μ g/ml). Supernatants were analyzed for IL-1 β (A, C) and TNF α (B, D) by ELISA. Data are presented as mean \pm SEM and are representative of three independent experiments (n=8 mice per group). *** $P \leq 0.001$. Statistical evaluation of differences between the experimental groups was determined by using non parametric *Mann Whitney U test*.

Figure S4: Reduced cell death in *Casp1*^{-/-} macrophages upon HDM stimulation.

Bone marrow derived macrophages from WT or *Caspase-1*-deficient mice were stimulated with HDM or LPS. Cell death was analyzed by propidium iodide staining and expression of Annexin V (A). Dot plots from one experiment representative of two similar independent experiments is shown.

REFERENCES

- Besnard, A.G., Guillou, N., Tschopp, J., et al. (2011). NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy* 66, 1047-1057.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, et al. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430, 213-218.

Figure S1

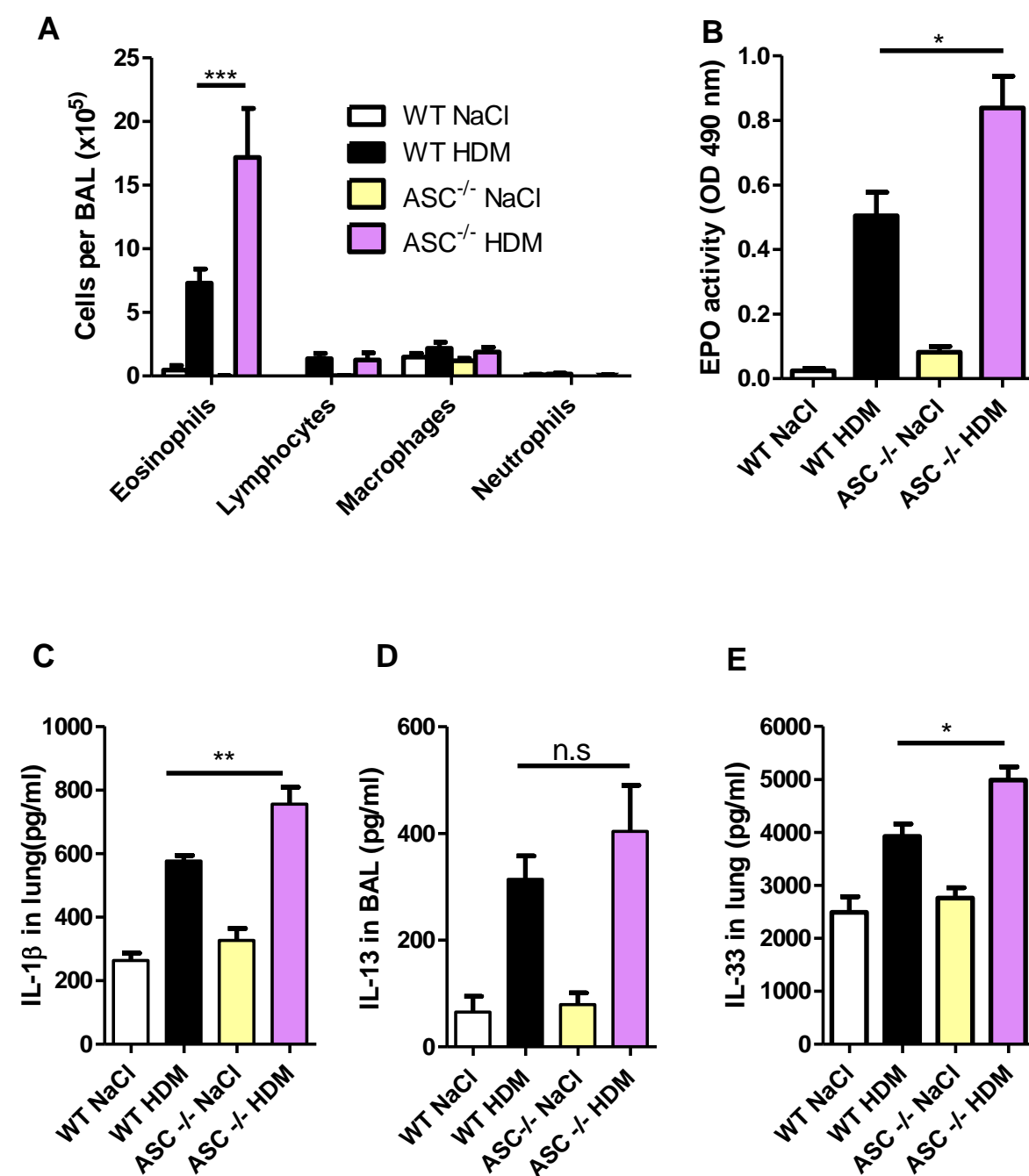


Figure S1

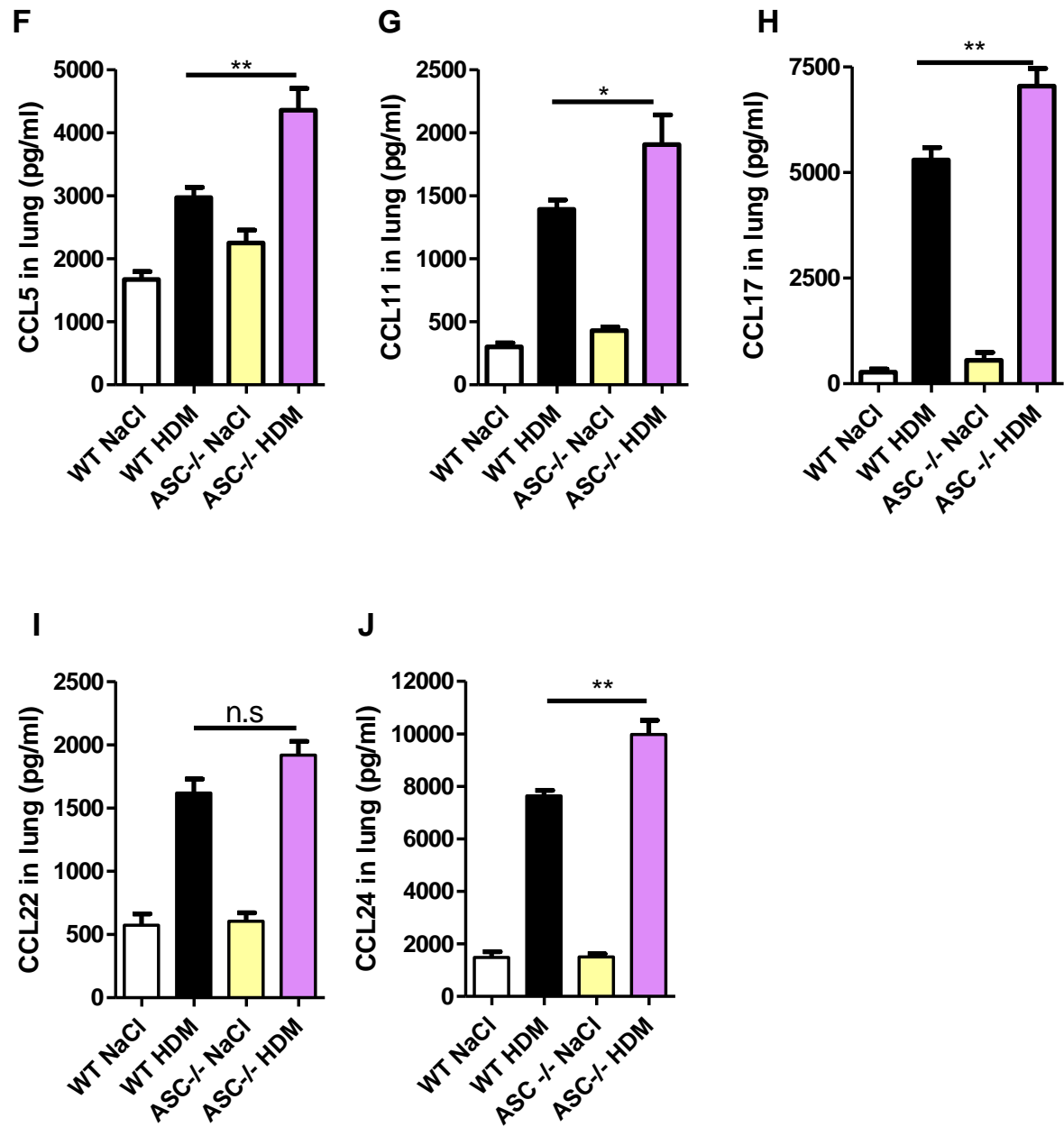


Figure S1

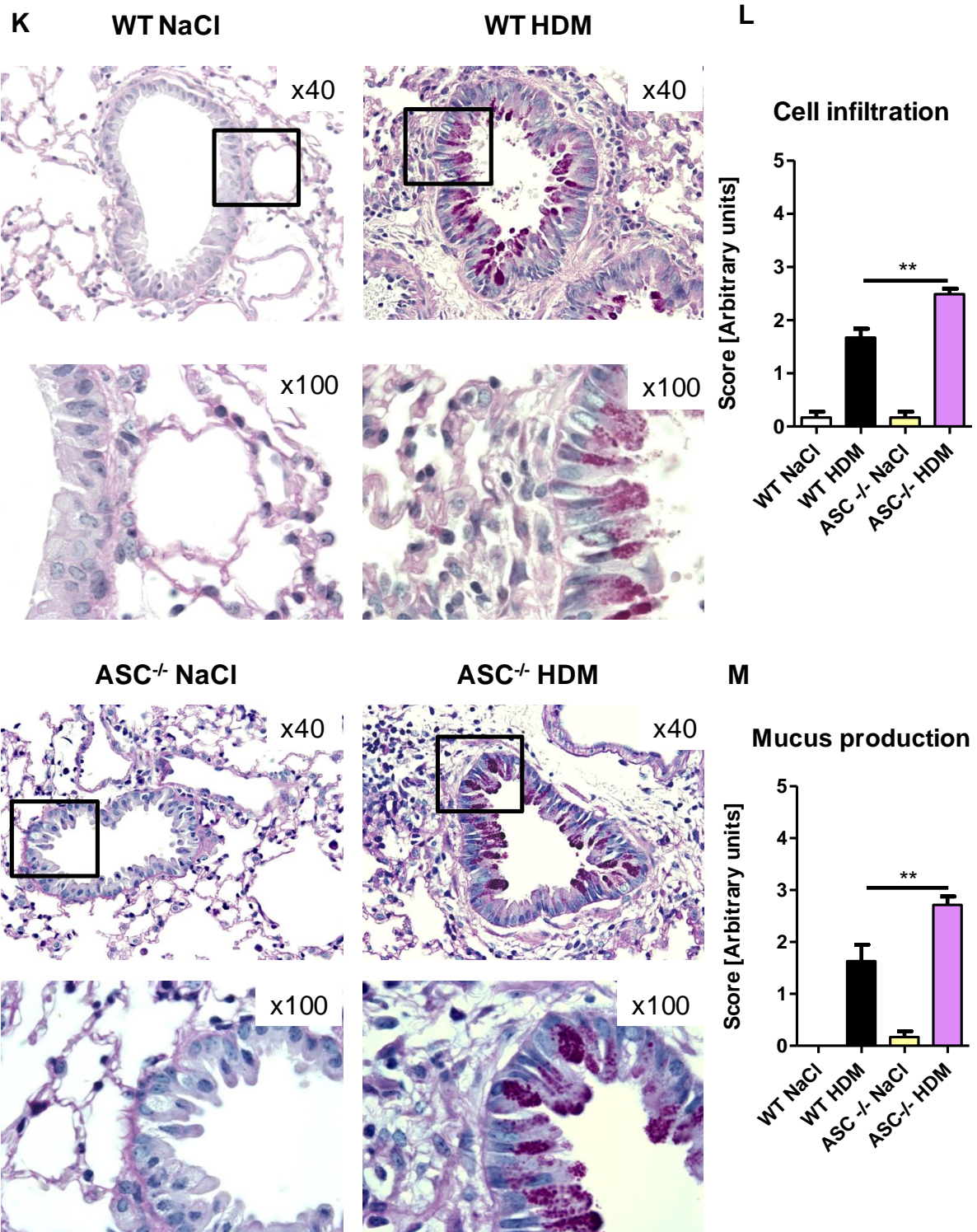


Figure S2

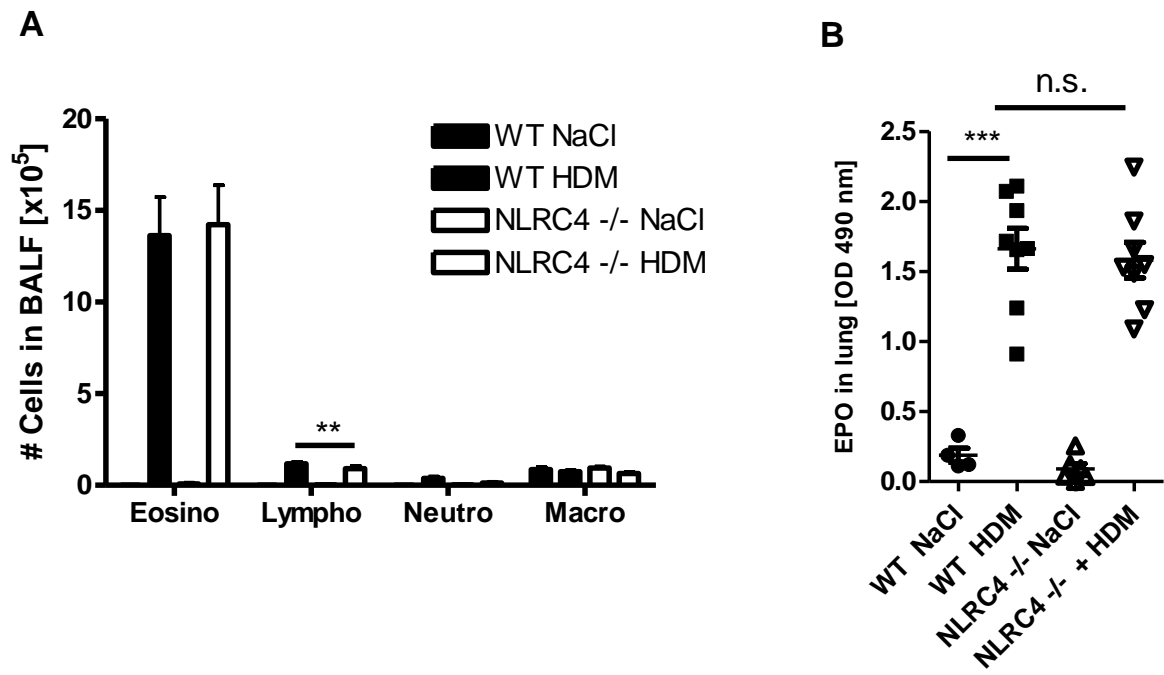


Figure S2

C

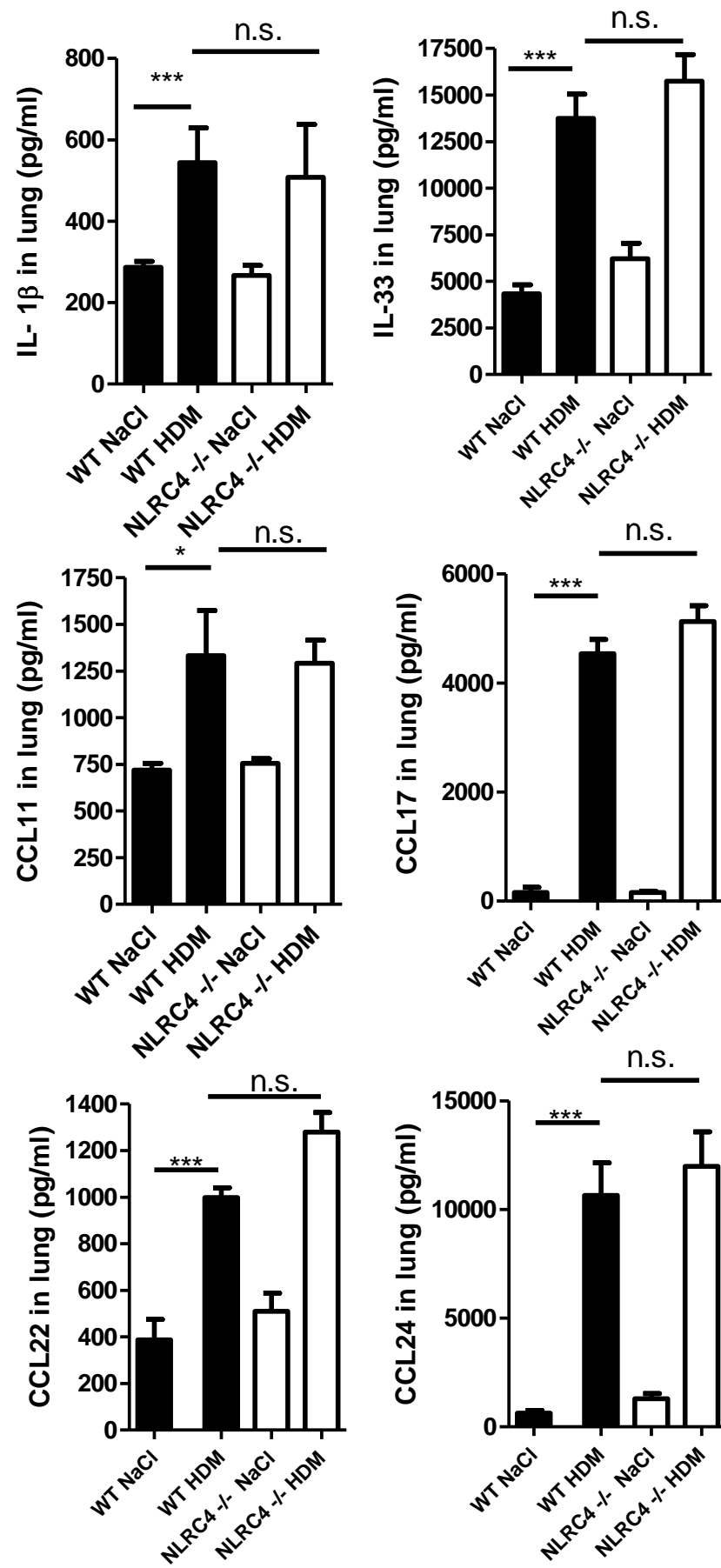


Figure S2

D

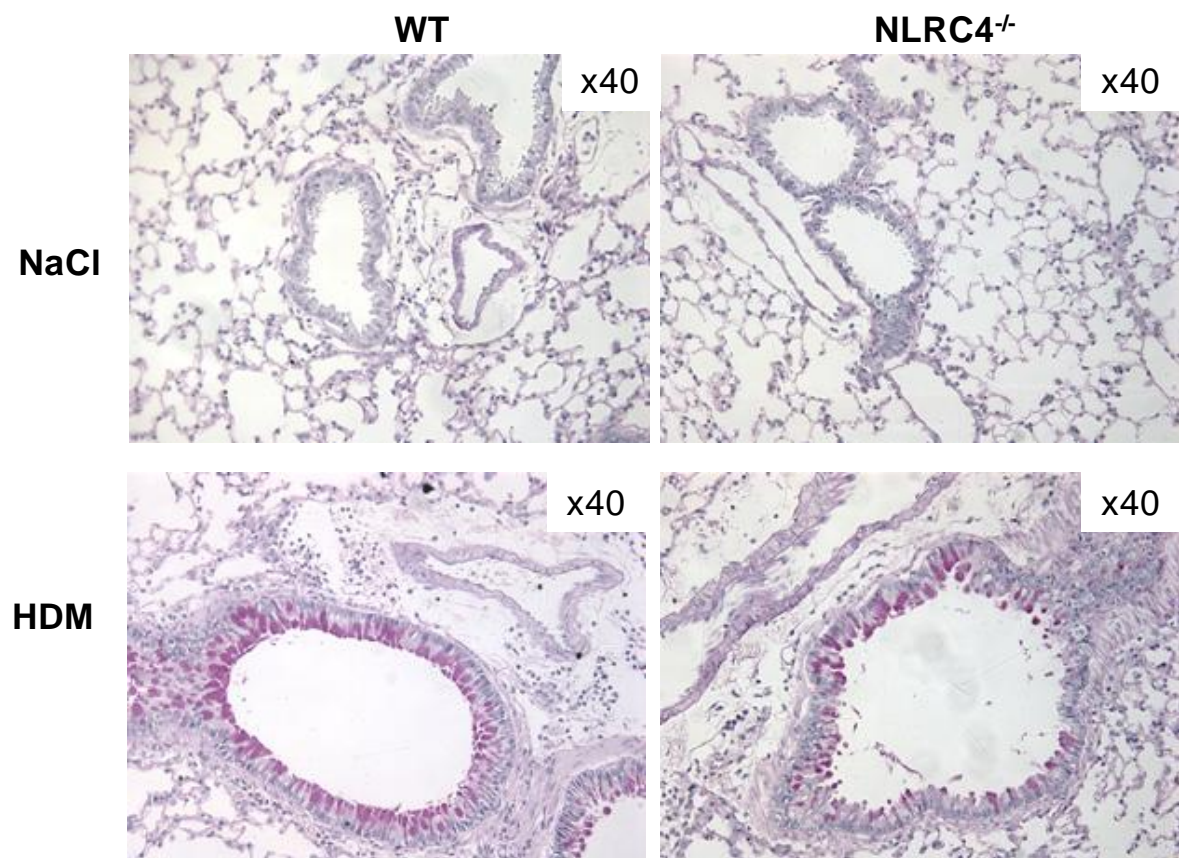
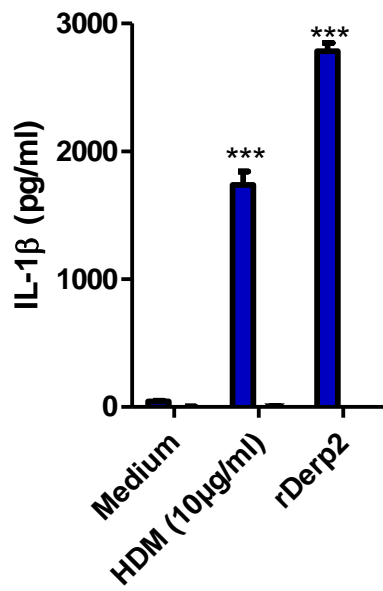


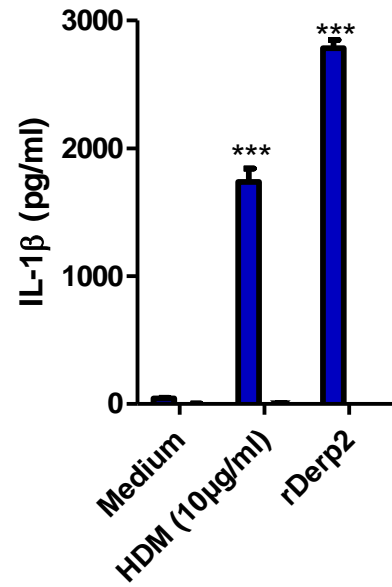
Figure S3

■ WT
■ Casp-1^{-/-}

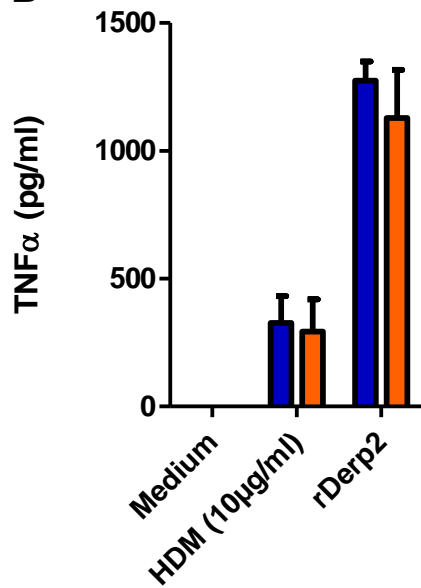
A Macrophages



C Dendritic cells



B



D

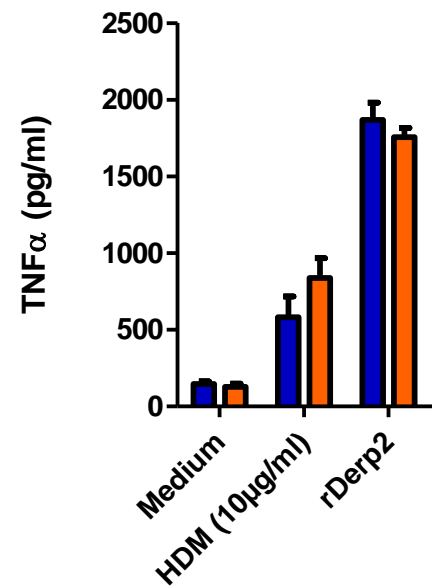
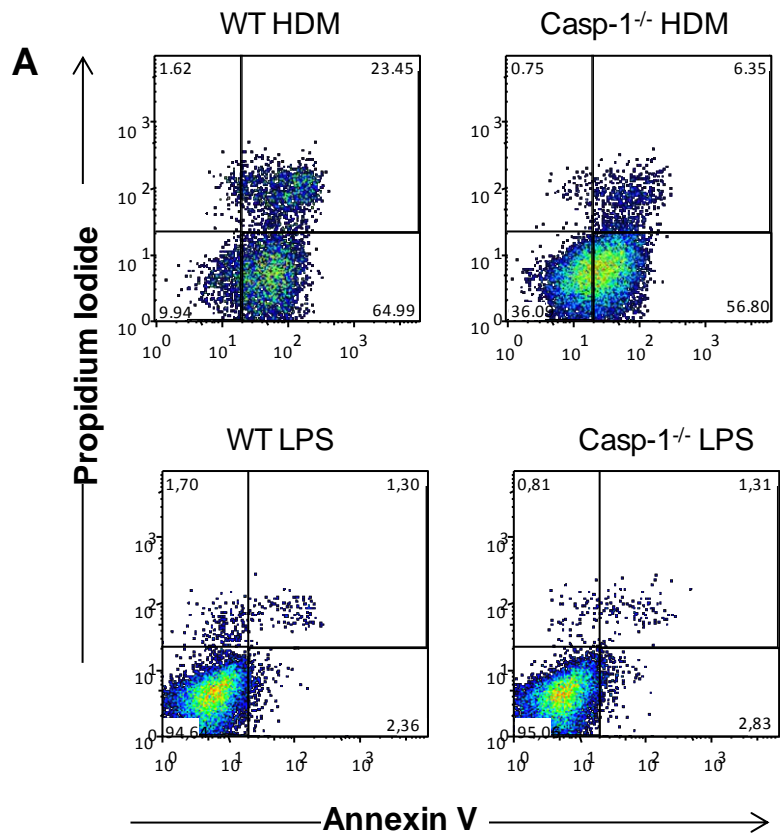


Figure S4



2^{ème} partie (Article 2): La protéine kinase C θ contrôle la réponse Th2 à l'allergène d'acarien House Dust Mite (HDM) en inhibant la signalisation NFAT-1 et IRF4.

PKC θ controls Th2 responses to house dust mite allergen by inhibiting NFAT1 and IFR4 signaling

Fahima Madouri¹, Louis Fauconnier², Pauline Chenuet¹, Margaux Gallerand², Tiffany Marchiol², Nathalie Rouxel², Aurélie Ledru², François Erard¹, Fabrice Trovero², Valérie F.J. Quesniaux¹, Bernhard Ryffel^{1,*} & Dieudonnée Togbe^{2*}.

Résumé

L'interaction du CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) des cellules dendritiques présentatrices d'antigène et du TCR (T Cell Receptor) des lymphocytes T naïfs, ainsi que la costimulation à travers des molécules comme CD28, permettent la formation d'une synapse immunologique. La protéine kinase C θ (PKC- θ) est un isoforme de la famille des protéines kinase C dont l'activation est indépendante du calcium. Il s'agit d'une sérine/thréonine kinase recrutée au niveau de cette synapse immunologique. Cet événement conduit au recrutement de Carma-1, une protéine MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) capable de former un complexe avec deux autres protéines (Bcl10 et Malt-1). Ce complexe étant nécessaire pour l'activation de NF- κ B et donc l'activation et la prolifération des cellules T dans plusieurs pathologies inflammatoires dont l'asthme allergique (Zanin-Zhorov, Ding et al. 2010).

Des données de la littérature suggèrent le rôle critique de PKC- θ dans développement de la réponse Th2 *in vivo* chez la souris (Marsland, Soos et al. 2004). Cependant, aucune donnée de la littérature ne relie cette protéine à la réponse innée. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés au recrutement des cellules lymphoïdes innées (ILC2) dans les poumons de souris déficientes pour PKC- θ après immunisation et provocation avec l'allergène d'acarien HDM. En effet, les ILC2 sont des cellules nouvellement découvertes impliquées dans la réponse immunitaire innée et dans le développement de la réponse Th2. Nous avons découvert une diminution du recrutement des ILC2 en absence de PKC θ .

D'autres part, nous avons cherché par quel mécanisme PKC θ médiait la réponse Th2 et avons démontré l'inhibition des facteurs de transcription IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) et NFAT-1 (Nuclear Factor of Activated T cell) dans les poumons des souris déficientes pour PKC- θ traitées avec l'allergène d'acarien HDM.

Comme nos résultats suggèrent que la protéine kinase C θ pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle, nous avons administré pour la première fois à des souris sauvages un inhibiteur spécifique de cette protéine, le composé 20 (compound 20 ou C20). En effet, cet inhibiteur a été utilisé dans la littérature pour des expériences *in vitro* sur des Treg (lymphocyte T régulateur) et des Teff (Lymphocyte T effecteur) (Zanin-Zhorov, Ding et al. 2010). L'inhibition spécifique de PKC- θ augmente les fonctions suppressives des Treg *in vitro*. Ainsi, le fait d'inhiber PKC- θ permettrait de diminuer la réponse Th2 et d'augmenter l'effet protecteur des lymphocytes T régulateurs.

Au total, nos résultats montrent que PKC- θ est une protéine jouant un rôle critique dans l'activation des ILC2, la présentation d'antigène par les cellules dendritiques et la différenciation Th2 dépendent des facteurs de transcription IRF4 et de NFAT-1. Ainsi, PKC- θ pourrait être une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'asthme allergique induit par HDM.

Les résultats présentés ci-dessous n'ont pas encore été publiés et sont en cours de soumission.

ARTICLE

PKC theta controls ILC2 and Th2 responses to house dust mite allergen by inhibiting NFAT1 and IRF4

Fahima Madouri¹, Louis Fauconnier², Pauline Chenuet¹, Margaux Gallerand², Tiffany Marchiol², Nathalie Rouxel², Aurélie Ledru², François Erard¹, Fabrice Trovero², Valérie F.J. Quesniaux¹, Bernhard Ryffel^{1,*} & Dieudonné Togbe^{2*}.

¹ Laboratory of experimental and molecular immunology and neurogenetics (INEM), UMR 7355 CNRS-University of Orleans, 3B, rue de la Ferrollerie, F-45071 Orleans-Cedex2, France, University of Orleans

² Artimmune SAS, 13 Avenue Buffon, 45100-Orléans, France

Corresponding author: Dieudonné Togbe, PhD; Artimmune SAS; 13, Avenue Buffon, 45100 Orléans, France, Phone: +332 38 25 79 80; Fax: + 332 38 25 79 79

dieudo.togbe@artimmune.com, dtogbe@cnrs-orleans.fr

Bernhard Ryffel, MD, PhD-Experimental and molecular Immunology and Neurogenetics, UMR 7355 CNRS-University of Orleans, 3B, rue de la Ferrollerie, F-45071 Orleans-Cedex2, France, Phone:+332 38 25 54 38; Fax: + 332 38 25 79 79, bryffel@cnrs-orleans.fr

Word count: 3318

Author contributions

DT, BR conceived the study; FM, LF, PC, MG, TM, NL, AR, DT performed experiments and analyzed the results; VQ, FE, FT provided materials, critically read and comment the paper, FM, DT, BR wrote the paper.

Additional information

This article contains **online supporting information**

Conflict of interest: the authors state no conflict of interest.

Declaration of all sources of funding: This work was support by University of Orleans, la Région Centre (HabitAsthme N° 2012-00073535 and Inflammation et Infection N° 2013-00085470) and Conseil Général 45 to F.Madouri PhD fellowship. Compound 20 (C20) was obtained from Maryanne Brown, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc, USA. House dust mite and birch pollen extracts were obtained from Dr Laurent Mascarell from Stallergenes, Antony, France and Carolina Rask, ALK Abello, Horsholm, Denmark.

ABSTRACT: 151 words

Protein Kinase C theta (PKC- θ), a serine/threonine kinase is involved in T cell activation and proliferation. The mechanism by which PKC- θ drives innate immune cells to instruct Th2 responses remain largely unknown in allergic lung inflammation using the most common indoor allergen house dust mite (HDM). We hypothesized PKC- θ is necessary for innate lymphoid cell 2 (ILC2) activation. Here we report that mice lacking PKC- θ had reduced ILC2 and Th2 cell recruitment and activation and cardinal features of allergic lung inflammation including airway hyperresponsiveness. PKC- θ triggering caused T cell activation and expression of the transcription factors IRF4 and NFAT1. Importantly, the pharmacological PKC- θ inhibitor (compound 20) given during the challenge phase with HDM or birch pollen allergens significantly reduced allergic asthma including IRF4 and NFAT1 expression.

Therefore, our findings identify PKC- θ signaling as critical for ILC2 activation, antigen presentation by DCs and Th2 cell differentiation that is IRF4 and NFAT1 dependent.

INTRODUCTION

Allergic asthma is an inflammatory pulmonary disease associated with aberrant innate and adaptive immune responses to allergens. The key clinical features of the disease are underpinned by mucus hypersecretion, inflammatory infiltrates and airway lesions. Asthma is typically characterized by CD4⁺-Th2 responses and their related secreted cytokines, namely, IL-4, IL-5 and IL-13 (Paul and Zhu 2010). Asthma is induced by several allergens such as innocuous antigen ovalbumin (OVA) and protease antigens including birch pollen (BP), animal dander, papain or house dust mite (HDM).

HDM contains several antigens with protease activity and plays an important role in initiating as well as sustaining inflammation and is required for the induction of Th2 and IgE responses (Chambers, Brown et al. 1998; Gough, Schulz et al. 1999; Kheradmand, Kiss et al. 2002). HDM causes epithelial barrier dysfunction with disruption of tight junctions, the production of pro-inflammatory cytokines and modulates function of various cell types including Th2 response (Gough, Schulz et al. 1999; Wan, Winton et al. 1999; Chapman, Wunschmann et al. 2007; Thomas, Hales et al. 2010; Gregory and Lloyd 2011; Takai and Ikeda 2011; Jacquet 2013).

The interactions between naive T lymphocytes and antigen presenting cells (APC) via the presentation of antigen from the major histocompatibility complex (MHCII) to the T cell receptor (TCR) and costimulation through molecules such as CD28 (Marsland, Soos et al. 2004) allow the formation of an immunological synapse which comprises Protein Kinase C Theta (PKC- θ) (Zanin-Zhorov, Dustin et al. 2011). The recruitment of PKC- θ into the immunological synapse is required for full effector T lymphocyte activation (Zanin-Zhorov, Ding et al. 2010). PKC- θ regulates T cell

activation in several inflammatory disease models such as allergic asthma, multiple sclerosis, arthritis and inflammatory bowel disease (IBD) (Marsland, Soos et al. 2004; Salek-Ardakani, So et al. 2004). PKC- θ is critical for the activation of several transcription factors such as NF κ B, Nuclear factor of activated T-cells (NFAT), C-Jun, C-Fos and AP-1 (Thome 2004) and promotes the development of Treg cells by enhancing Foxp3 expression via activation of the calcineurin/NFAT pathway (Gupta, Manicassamy et al. 2008).

More recently innate lymphoid cells 2 (ILC2) have been identified as critical source for the production of an early Th2 type cytokine response (Halim TY et al, McKenzie A 2012). Very little is known whether ILC2, NFAT and IRF4 activation is PKC- θ dependent.

Here we uncovered the cellular and molecular mechanism by which PKC- θ drives allergic airway inflammation induced by HDM affecting antigen presentation, ILC2 and Th2 cell activation. We show that PKC- θ deletion decreases first the emergence of ILC2 followed by reduced Th2 cell response through the inhibition of the NFAT1 and IRF4 activation. Pharmacological inhibition of PKC- θ by a specific PKC- θ inhibitor (C20) markedly reduced cardinal features of allergic lung inflammation induced by HDM or birch pollen Bet v1 (BP).

METHODS

Animals

PKC- θ -deficient mice on C57BL/6 background (7–8 weeks old) were generated by Littman D. laboratory (Sun, Arendt et al. 2000) and obtained from Manfred Kopf (Molecular Biomedicine, ETH Zürich, Switzerland) were bred in our animal facility at the Transgenose Institute (CNRS, Orleans). Mice were on C57BL/6J genetic background (back-crossed at least 15 times) and wild-type C57BL/6J (WT) mice were used as control. Mice were maintained under specific pathogen-free conditions in our specific animal facility at CNRS, Orléans, France. Mice were maintained in a temperature-controlled (23°C) facility with a strict 12 h light/dark cycle with food and water provided ad libitum. Experiments were performed with gender-matched mice aged 8-10 weeks. All protocols were approved by the CNRS institutional animal research ethical committee and complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

HDM induced allergic airway inflammation induction

To induce HDM-driven eosinophilic airway inflammation, isoflurane anesthetized mice were administered intranasally twice at days 0 and 7 with 25 μ g HDM extracts (ALK –Abello, Danemark) without adjuvant, control mice were challenged with saline alone and were challenged on days 14-16 with 5 μ g of HDM extracts.

Twenty four hours after the last challenge, mice were sacrificed; bronchoalveolar lavage (BAL) and lung were collected for EPO enzyme, cytokines, chemokines, histology, qPCR and airway hyperreactivity and Western blot analysis.

Inhibition of PKC θ in vivo with Compound 20 (C20)

To inhibit PKC- θ *in vivo*, mice received during challenge from day 14-16 by oral route, 10 mg/kg of PKC- θ selective inhibitor Compound 20, (C20/ BIX02656, Boehringer Ingelheim) as described previously (Zanin-Zhorov, Ding et al. 2010).

Bronchoalveolar lavage (BAL)

BAL was performed by washing the lungs four times with 0.5 ml of saline solution at room temperature. After centrifugation at 400 x g for 10 min at 4°C, the supernatant (cell-free BAL fluid) was stored at -20°C for cytokine analysis. FACS on BAL and lung mononuclear cells was performed.

Pulmonary eosinophil peroxidase (EPO) activity

EPO activity was determined in order to estimate the recruitment of eosinophils to the lung parenchyma as described (Besnard, Togbe et al. 2011).

Determination of bronchial hyperresponsiveness (AHR)

For invasive measurement of dynamic resistance, mice were anesthetized with intra-peritoneal injection of solution containing ketamine (100 mg/kg, Merial) and xylazine (10 mg/kg, Bayer), paralyzed using D-tubocurarine (0.125%, Sigma), and intubated with an 18-gauge catheter. Respiratory frequency was set at 140 breaths per min with a tidal volume of 0.2 ml and a positive end-expiratory pressure of 2 ml H₂O. Increasing concentrations of aerosolized methacholine (9.375, 18.75, 37.5, 75 and 150 mg/ml) were administered. Resistance was recorded using an invasive plethysmograph (Buxco, London, UK). Baseline resistance was restored before administering the subsequent doses of methacholine.

Lung mononuclear cells isolation

Lung mononuclear cells were isolated from WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice 24h after the last challenge as described previously (Hachem, Lisbonne et al. 2005). Briefly the aorta and the inferior vena cava were sectioned and the lungs were perfused with saline. The lobes of the lungs were sliced into small cubes and then incubated for 45 min in 2 ml RPMI 1640 solution containing DNase I (1 mg/ml) and collagenase IV (2 mg/ml) (Sigma-Aldrich). Lung mononuclear cells were separated by centrifugation on discontinuous Percoll (Amersham Biosciences) gradients (35%/70%). Isolated lung mononuclear single cells were plated in round bottom 96-well plates (2×10^6 /ml) and restimulated 4h in vitro with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml; both from Sigma-Aldrich) in complete medium (IMDM supplemented with 5% (vol/vol) FCS, L-glutamine (2 μ M), penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 μ g/ml) and β -Mercaptoethanol (50 nM) all from Invitrogen).

Flow cytometry analysis on BAL and lung mononuclear cells

Single cell suspensions were prepared from BAL, after blockade of Fc receptors with CD16/32 blocking antibody, cells were stained with antibodies in FACS buffer (D-PBS, containing 3% heat-inactivated FCS and 0.005% NaN₃) for 30 minutes with APC-conjugated anti-I-Ad/I-Ed (macrophages/DCs), PE-conjugated anti-SiglecF (clone E50-2440) (eosinophils), FITC-conjugated anti-CD3 (clone 145-2C11) and anti-CD45R/B220 (clone RA5-6B2) (lymphocytes), efluor450-conjugated anti F4/80 (clone BM8) and biotin-conjugated anti-CD11c (clone HL3) (macrophages/DCs). Differential cell counts were analyzed by flow cytometry, and cytopins as previously described (van Rijt, Kuipers et al. 2004).

Lung mononuclear cells were stained with PerCP-conjugated CD45 (clone 30F11), FITC -conjugated CD3 ϵ (clone 145-2C11), v450-conjugated CD4 (clone RM4-5), APC-Cy7 -conjugated CD8 α (clone 53-6.7), PECy7 labeled CD69 (clone H1.2F2), biotin-conjugated Lin (monoclonal antibodies against: CD5, CD11b, CD45R, anti-7-4, anti-Gr-1 (Ly6G/C), and anti-Terr-119, Miltenyi Biotec), PE-conjugated Sca1 (clone D7, eBioscience), FITC-conjugated IL-33R (clone D8) and c-kit (CD117, clone 2B8, eBioscience). After washing, cells were permeabilized for 20 min with cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences, France) and stained with PE-conjugated IL-4 (clone 11B11), APC-conjugated IL-5 (clone TRFK5), APC-conjugated IL-13 (clone ebio13A, eBioscience) or APC-conjugated FoxP3 (clone FJK-16s, eBioscience). All antibodies used in this were from BD Biosciences, unless otherwise specified. Data were acquired using FACS Canto II flow cytometer and analyzed using Diva and FlowJo software.

Antigen uptake and processing assays.

BMDCs (10^6 cells) were incubated for 2 h at 4 °C or 37 °C with 50 μ g of ovalbumin coupled to fluorescein isothiocyanate alone or OVA-DQ (Molecular probes, Invitrogen). After incubation, cells were collected, thoroughly washed and analyzed by flow cytometry (Canto II, BD Bioscience).

Proliferation assay.

A single-cell suspension was isolated from lymph nodes, CD4 $^{+}$ T cells were purified by magnetic separation (Dyna, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and proliferation was determined as described (Besnard, Togbe et al. 2011).

Briefly purified CD4⁺ T cells (10⁵ cells) from WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice were co-cultured with 10⁴ WT dendritic cells preloaded with HDM (10 μ g/ ml, 2h). T cell proliferation was assessed by CFSE staining (0.5 μ M; Molecular probes, Invitrogen).

Lung histology

Lungs were fixed in 4% buffered formaldehyde and 3 μ m sections were stained with periodic acid Schiff reagent (PAS) and examined with a Leica DM2500 microscope (x40 magnification). Peribronchial infiltrates and mucus hypersecretion were assessed by a semi-quantitative score (0-5) by two observers independently as described before (Besnard, Togbe et al. 2011).

Cytokines measurement by ELISA

IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p40, IL-13, IL-33, IFN γ , GM-CSF, CCL11 (Eotaxin), CCL17 (TARC), CCL20, CCL22 (MDC) and CCL24 (Eotaxin2) concentrations in cell culture supernatant from mediastinal lymph nodes or lung homogenate were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using commercial kits from R&D (Abingdon, UK) according to the manufacturer's recommendations or by multiplex (MagPix, Biorad).

Immunoblotting

Lung tissues were homogenated in Tris-HCl 0,05M pH8 with Polytron PT 2100 (Kinematica AG). Protein concentration was determined using the Bradford method (Bio-Rad). Equal amounts of protein (30 μ g/sample) were denaturated by boiling (95°C, 5min), separated by SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose membranes

(GE Healthcare). The membrane was blocked in Tris-buffer saline (TBS), tween 20, containing 5% lipid free dry milk. Antibodies used for detection were diluted in Tris-buffer saline, tween 20, containing 5% (TBST) lipid free dry milk and were from Sigma unless otherwise stated.

The control β -actin was detected with primary mouse anti β -actin antibody followed by biotinylated secondary antibody HRP conjugated goat anti-mouse Ig. NFAT1 (NFATc2) were detected with primary polyclonal anti-mouse NFAT1 (Cell Signaling) followed by a secondary antibody HRP conjugated goat anti-rabbit Ig (Cell Signaling). Immuno-reactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare).

Muc5ac and IRF4 mRNA expression

Total RNA was isolated from homogenized mouse lung using Tri Reagent (Sigma) and quantified by NanoDrop (Nd-1000). Reverse transcription was performed with SuperScript III Kit according to manufacturers' instructions (Invitrogen). cDNA was subjected to quantitative PCR using primers for Muc5ac (*sense* 5'CAGCCGAGAGGAGGGTTTGATCT and *anti-sense* 5'AGTCTCTCTCCGCTCCTCTCA; Sigma) and IRF4 (Qiagen). Relative transcript expression of a gene is given as $2^{-\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = C_{t\text{target}} - C_{t\text{reference}}$), relative changes compared with control are $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{treated}} - \Delta C_{t\text{control}}$) (John, Kohse et al. 2014).

Statistical analysis

A Mann-Whitney U analysis and non parametric Kruskal-Wallis followed with Dunns post test was performed tests were used to determine significant differences between groups using GraphPad Prism version 5.00, software. Data are expressed as mean \pm SEM. Statistically significant differences were defined as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$).

RESULTS

Reduced innate lymphoid cell recruitment in PKC- θ ^{-/-} mice

Upon allergen activation innate lymphoid cells (ILC2) expressing Th2 cytokines are the first cells to be activated in the lung (Walker, Barlow et al. 2013). No data exist on the role of PKC- θ in the innate immune response. Therefore we examined the pulmonary recruitment of ILC2 in the lung of HDM immunized mice following three antigen challenges in PKC- θ ^{-/-} mice (Fig. 1a). The emergence of total Lin⁻IL-5⁺ and Lin⁻IL-13⁺ ILC2 counts was dramatically reduced in PKC- θ ^{-/-} mice as compared to HDM stimulated WT mice (Fig. 1b-e). This data suggest that the activation of the T cell synapse leading to ILC2 activation is PKC- θ dependent. We then asked whether the inhibitory effect correlated with a diminished adaptive Th2 response.

PKC- θ ^{-/-} mice are resistant to Th2-driven airway inflammation

Th2 cells drive the adaptive immune response in allergic airway inflammation and PKC- θ has been shown to be important for the response to ovalbumin (Herrick and Bottomly 2003; Marsland, Soos et al. 2004). WT or PKC- θ ^{-/-} mice were treated as reported in Fig 1 a, bronchoalveolar lavages (BAL) was performed for inflammatory cell recruitment. Saline sensitized and challenged WT and PKC- θ ^{-/-} mice were used as a negative control and did not exhibit any inflammatory response, as evidenced by the negligible number of leukocytes in the BAL fluid. However, WT mice which were HDM sensitized and challenged had a dramatic increase in the total leukocyte number in the BAL fluid (Fig. 2a). The predominant infiltrate in BALF consisted of eosinophils and EPO activity in the lung (Fig. 2b-c), with lower lymphocytes counts (Fig. 2d), macrophages and very few neutrophils (data not shown). In striking contrast, HDM-primed PKC- θ deficient mice (PKC- θ ^{-/-} HDM) exhibited a 3 fold lower

total leukocyte counts in the BAL fluid compared with their wild type counterparts (Fig. 2a). In particular, there was a dramatic decrease in eosinophilia (3-fold reduction) (Fig. 2b-c), as well as a lower lymphocytes counts (2-fold reduction compared with WT-HDM) (Fig. 2d) whereas the macrophage counts were not significantly affected (data not shown).

A hallmark of allergic lung inflammation is airway resistance, which was measured by invasive plethysmography in WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice. PKC- $\theta^{-/-}$ mice treated with HDM had reduced pulmonary resistance as compared to WT mice (Fig. 2e).

Histological analysis revealed a prominent lung inflammatory response characterized by perivascular and peribronchiolar infiltration of eosinophils and mononuclear cells in WT-HDM mice (Fig. 2f). By contrast, a significant reduction of inflammatory cell infiltration was found in PKC- $\theta^{-/-}$ mice, consistent with the reduced number of cell in the BAL fluid (Fig. 2g). Additionally, the extensive goblet cell hyperplasia and mucus production observed in primed WT mice was drastically reduced in PKC- $\theta^{-/-}$ mice, since approximately 80% of goblet cells stained strongly with PAS in WT mice versus only approximately 10%–20% in PKC- $\theta^{-/-}$ mice (Fig. 2h). The reduced mucus hyperplasia was confirmed at the mRNA expression level for Muc5ac (Fig. 2i).

Moreover, pro-inflammatory cytokines such as IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-13 were significantly reduced (2-3 fold reduction) in lung of PKC- $\theta^{-/-}$ - HDM compared with WT-HDM (Fig. 3a-d). By contrast, IL-33 and IL-12 levels were unchanged in both conditions, while IFN γ was increased in absence of PKC- θ (Fig. 3e-g).

In addition, in the absence of PKC- θ significant lower levels of neutrophils/monocytes-attracting chemokines CXCL1 (2 fold reduction), eosinophil-attracting chemokines CCL11 and CCL24 (2 fold reduction) as well as Th2 cell–

attracting chemokines CCL17 and CCL20 (approximately 2 fold reduction) were found in the lungs as compared with WT-HDM mice (Fig. 3h-l).

We further investigated the recruitment of Th2 cells in the lung in HDM challenged mice and found an increase of TCR β ⁺ cells expressing IL-4 (Supplementary Fig. S1a-c) and IL-5 (Supplementary Fig S1d-f). In the absence of PKC- θ the number of TCR β ⁺IL-4⁺ and TCR β ⁺IL-5⁺ cells were significantly reduced concomitant with reduced IL-4 level in the lung.

PKC- θ modulates IRF4 and NFAT1 expression

The transcription factors IRF4 and NFAT1 are known to promote the expression of Th2 cell differentiation and function including IL-4, IL-5 expression and contribute to IL-10 production (Rengarajan, Mowen et al. 2002; Ahyi, Chang et al. 2009; Williams, Tjota et al. 2013). To more closely analyze the transcription factors involved in the PKC- θ phenotype upon HDM exposure we investigated the expression of IRF4 by qPCR (Fig. 3m) and NFAT1 (NFATC2) by Western Blot analysis (Fig. 3n). We found a distinct reduction of these transcription factors in PKC- θ deficient lungs, which was associated with reduced IL-10 production in lung (data not shown). Therefore the data suggest that PKC- θ regulates NFAT1 and IRF4 activation, which is related to reduce IL-10 expression.

PKC- θ determines lung Th2 cell recruitment and activation

We investigated whether the recruitment and activation of CD45⁺CD3⁺e T cells are different in the lung from PKC- θ ^{-/-} versus WT mice upon HDM challenge (Fig. 4a,c). Consistent with the reduced allergic response total CD4⁺ T cell recruitment within the

CD45⁺ CD3⁺e population was reduced, and T cells have a reduced expression of the activation marker CD69 (Fig. 4b,d).

Since regulatory T cells may contribute to the overall response to the allergen HDM, we determined the pulmonary Treg cell numbers and found a significant reduction of FoxP3 cells in the absence of PKC- θ (Fig. 4e-g).

PKC- θ is expressed in NK cells and was found to be important for tumor control, IFN γ and TNF α production and the function of NKT cells (Page, Chaudhary et al. 2008; Tassi, Cella et al. 2008; Fang, Wang et al. 2012). To determine whether PKC- θ is involved in NKp46 cells recruitment, we isolated mononuclear cells from the lung of PKC- $\theta^{-/-}$ versus WT mice upon HDM challenge. Similar CD45⁺NKp46⁺ cell counts were found compared in PKC- $\theta^{-/-}$ and WT control mice (Supplementary Fig. S2a-c). However at steady state level NK1.1⁺ cell counts were reduced in PKC- $\theta^{-/-}$ mice (Supplementary Fig. S2d,e).

Collectively, these data demonstrate that PKC- θ is required for the pulmonary recruitment and activation of Th2 cells and Foxp3⁺ Treg cell recruitment.

PKC- θ deficient APC process the allergen, but cannot activate T cells in vitro

To exclude any effect on antigen uptake and processing we investigated these parameters in DCs using OVA as antigen. The uptake and processing in PKC- $\theta^{-/-}$ DC was not different from WT DC (Fig. 5a-b) and equal amounts of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 were found after HDM stimulation (data not shown). However, PKC- $\theta^{-/-}$ DC expressed reduced amounts of class II antigens on the surface (Fig. 5c). We further analyzed the ability of the DC to produce pro-

inflammatory cytokines upon HDM activation and found reduced IL-1 α production (Fig 5, *D*), while IL-1 β and IL-10 were not affected (Fig. 5e,f).

Co-culture of WT-DC primed with HDM with naïve CD4⁺ T cells induced a robust cell proliferation of CFSE labeled T cells and IL-2 production, which was dramatically reduced when co-cultured with PKC- $\theta^{-/-}$ CD4⁺ T cells (Fig. 5g,h). Therefore, PKC- $\theta^{-/-}$ CD4⁺ T cells are unable to respond to HDM *in vitro*. The lack of the response in PKC- $\theta^{-/-}$ mice may be at level of the T cells and of DCs due to reduced IRF4 expression, since DC activation relies on IRF4 expression (Gao, Nish et al. 2013). Consistent with published data PKC- $\theta^{-/-}$ T cells do not respond to TCR activation by CD3e antibody (Fig. 5i). The data reveal diminished T cell and DC activation suggesting a defect of signaling at the TCR synapse between PKC- $\theta^{-/-}$ DC and T cells.

PKC inhibitor (C20) reduces HDM induced ongoing allergic asthma

To determine the mechanism that may account for the suppressed allergic phenotype in response to PKC- θ signaling during the effector phase, we investigated the effect of the specific inhibitor C20 on HDM driven allergic airway response (Zanin-Zhorov, Ding et al. 2010). The administration of the PKC- θ inhibitor by gavage to WT mice during the HDM challenge phase (Fig. 6a) diminished significantly the inflammatory cell infiltration especially eosinophils and lymphocytes (2-3 fold reduction) (Fig. 6b-e), diminished airway resistance (Fig 6, *F*), reduced airway inflammation and mucus overproduction as evidenced by histological analysis and mRNA expression level for Muc5ac (Fig. 6g-j) as well as Th2 cytokine/chemokine production (IL-1 α , IL-1 β , CCL11, CCL17 and CCL24 (Fig. 6k-l; *n-p*). Moreover, IRF4 expression from pulmonary tissue is reduced, as well as NFAT1 production in lung (Fig. 6q-r).

Importantly, pulmonary cells produced similar amounts of IL-33 in response to HDM immunization either in the presence or absence of PKC- θ blockade (Fig. 6m).

Therefore disruption of the TCR synapse with the PKC- θ inhibitor C20 reduces IRF4 and NFAT1 expression and inhibits an ongoing allergic inflammation

PKC inhibitor attenuates birch pollen induced ongoing airway inflammation

To ascertain that the effect of pharmacological PKC- θ inhibitor C20 is not limited to the HDM induced allergic asthma model, we extended our study to birch pollen (BP, Bet v1) allergen induced experimental allergic asthma model. We found a significant inhibition of total cell, eosinophil and lymphocytes recruitment in BALF (Supplementary Fig. S3a-d) with a significant decrease of the airway resistance (Supplementary Fig. S3e), reduced airway inflammation and mucus overproduction as evidenced by histological analysis (Supplementary Fig. S3f-h) and reduced IL-1 α , IL-1 β , IL-13, CCL17, CCL20 and CCL24 levels in lung upon C20 administration to immunized WT mice during BP challenge (Supplementary Fig. S3i-n) as well as NFAT1 production in lung (Supplementary Fig. S3p). Moreover, pulmonary cells produced similar amounts of IL-33 in response to BP immunization either in the presence or absence of PKC- θ blockade (Fig. 3o). Therefore the data demonstrate that the PKC- θ C20 inhibitor confers robust inhibition in two models of established allergic lung inflammation in mice.

DISCUSSION

We demonstrate that the recruitment of ILC2s is PKC- θ dependent and likely required for efficient Th2 cell mediated allergic lung inflammation upon challenge with the protease allergen HDM. The reduced ILC2 and T cell recruitment and activation is linked to an inability to mount a strong allergic lung inflammation with impaired cardinal features of asthma including airway hyperresponsiveness and Th2 cytokines and chemokines release in PKC- θ deficient mice. This is the first report suggesting that ILC2 play a critical role in PKC- θ signaling pathway.

ILC2 are the first cells responding to allergens(Halim, Steer et al. 2014) and we show that the emergence of ILC2 is inhibited in the absence of PKC- θ . This finding is novel and PKC- θ is required for ILCs activation. ILC2 precedes the Th2 differentiation, which is drastically reduced in the absence of PKC- θ . We questioned whether IL-25 and IL-33 known to be involved in ILC2 activation resulting in IL-5 and IL-13 production, but did not find a difference of IL-33 and IL-25 expression (data not shown).

PKC- θ is involved in the T cell receptor synapse and inhibition of PKC- θ reduces the Th2 mediated response(Zanin-Zhorov, Dustin et al. 2011). While previous studies reported PKC- θ dependent OVA induced lung inflammation, we show here that all features of HDM and the birch pollen antigen Bet v1 induced allergic asthma are dramatically reduced in the absence of PKC- θ (Tourdou, Airouche et al. 2013).

Studies on the function of IRF-4 indicated either a transcriptional activator or repressor function depending on the context of the DNA-binding sequences and/or protein-interacting partners. IRF-4 interacts with its family member PU.1 or NFAT1 to synergistically enhance transcriptional activity of a variety of genes including IL-4 in T

cells and Th2 cells response(Gao, Nish et al. 2013). Our study reveals that IRF4 and NFAT1 expression are diminished in the absence of PKC- θ suggesting that PKC- θ mediated effect on ILC2 and Th2 cell activation relies on IRF4 and NFAT1 expression, which however needs to be further explored.

Furthermore we identified that dendritic cell functions are PKC- θ dependent. Specifically MHC class II expression is reduced and associated with the inability of HDM primed PKC- θ deficient T cell to mediate T cell proliferation and induce the production of IL-2. While we confirm that PKC- θ deficient T cells are unable to respond to TCR stimulation(Zanin-Zhorov, Dustin et al. 2011). We report a role of PKC- θ on DC activation and suggests that the defect is at the class II molecule dependent antigen platform; which may be related to reduced IRF4 expression consistent with data on IRF4 dependent signaling in DC cells controls Th2 responses(Gao, Nish et al. 2013). Therefore, NFAT1 and IRF4 expression in DC and T cells are likely PKC- θ dependent and contribute to allergic response.

Since the net inflammatory response depends on other factors we thought that augmented FoxP3 regulatory cells could contribute to reduced allergic response. However we found reduced FoxP3 cell counts in PKC- θ deficient lungs. Therefore Treg cells are unlikely involved in our model.

While we demonstrate that PKC- θ is required for the allergic response, it was unknown whether PKC- θ blockade could interrupt an ongoing inflammatory response of sensitized mice. To address this question we used the PKC- θ inhibitor and found that C20 had a potent therapeutic effect on ongoing HDM and BP induced allergic inflammatory responses with a drastic inhibition of the immune response, lung

inflammation and airway hyperreactivity. This is an important finding and suggests that PKC- θ should be explored further as therapeutic target in allergic lung diseases.

In conclusion our data suggest that PKC- θ acts via IRF4 and NFAT1 on ILC2 activation and T cell proliferation both contributing to a Th2 response in allergic lung inflammation in response to two different proteases allergens. This response is abrogated in PKC- θ deficient mice. Together with the potent inhibition of asthma by the PKC- θ inhibitor C20 during allergen challenge, suggest that PKC- θ may be a novel therapeutic target in asthma.

References

1. Paul WE, Zhu J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* **10**, 225-235 (2010).
2. Chambers L, Brown A, Pritchard DI, Sreedharan S, Brocklehurst K, Kalsheker NA. Enzymatically active papain preferentially induces an allergic response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 837-840 (1998).
3. Gough L, Schulz O, Sewell HF, Shakib F. The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. *J Exp Med* **190**, 1897-1902 (1999).
4. Kheradmand F, Kiss A, Xu J, Lee SH, Kolattukudy PE, Corry DB. A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease. *J Immunol* **169**, 5904-5911 (2002).
5. Chapman MD, Wunschmann S, Pomes A. Proteases as Th2 adjuvants. *Curr Allergy Asthma Rep* **7**, 363-367 (2007).
6. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol* **32**, 402-411 (2011).
7. Jacquet A. Innate immune responses in house dust mite allergy. *ISRN Allergy* **2013**, 735031 (2013).
8. Takai T, Ikeda S. Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases. *Allergol Int* **60**, 25-35 (2011).
9. Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. House dust mite allergens in asthma and allergy. *Trends Mol Med* **16**, 321-328 (2010).
10. Wan H, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* **104**, 123-133 (1999).
11. Marsland BJ, Soos TJ, Späth G, Littman DR, Kopf M. Protein Kinase C θ Is Critical for the Development of In Vivo T Helper (Th)2 Cell But Not Th1 Cell Responses. *The Journal of Experimental Medicine* **200**, 181-189 (2004).
12. Zanin-Zhorov A, Dustin ML, Blazar BR. PKC- θ function at the immunological synapse: prospects for therapeutic targeting. *Trends in Immunology* **32**, 358-363 (2011).
13. Zanin-Zhorov A, et al. Protein Kinase C- θ Mediates Negative Feedback on Regulatory T Cell Function. *Science* **328**, 372-376 (2010).

14. Salek-Ardakani S, So T, Halteman BS, Altman A, Croft M. Differential regulation of Th2 and Th1 lung inflammatory responses by protein kinase C theta. In: *J Immunol* (ed[^](eds). 2004/11/06 edn (2004).
15. Thome M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol* **4**, 348-359 (2004).
16. Gupta S, Manicassamy S, Vasu C, Kumar A, Shang W, Sun Z. Differential requirement of PKC- θ in the development and function of natural regulatory T cells. *Molecular Immunology* **46**, 213-224 (2008).
17. Sun Z, *et al.* PKC-[thetas] is required for TCR-induced NF-[kappa]B activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* **404**, 402-407 (2000).
18. Besnard A, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *European Journal of Immunology* **41**, 1675-1686 (2011).
19. Hachem P, *et al.* Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur J Immunol* **35**, 2793-2802 (2005).
20. van Rijt LS, Kuipers H, Vos N, Hijdra D, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. *J Immunol Methods* **288**, 111-121 (2004).
21. John G, *et al.* The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models. *Clinical Science* **126**, 207-221 (2014).
22. Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol* **13**, 75-87 (2013).
23. Herrick CA, Bottomly K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat Rev Immunol* **3**, 405-412 (2003).
24. Ahyi AN, Chang HC, Dent AL, Nutt SL, Kaplan MH. IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines. *J Immunol* **183**, 1598-1606 (2009).
25. Rengarajan J, Mowen KA, McBride KD, Smith ED, Singh H, Glimcher LH. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* **195**, 1003-1012 (2002).
26. Williams JW, *et al.* Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat Commun* **4**, 2990 (2013).
27. Fang X, Wang R, Ma J, Ding Y, Shang W, Sun Z. Ameliorated ConA-induced hepatitis in the absence of PKC-theta. *PLoS One* **7**, e31174 (2012).

28. Page KM, Chaudhary D, Goldman SJ, Kasaian MT. Natural killer cells from protein kinase C theta-/- mice stimulated with interleukin-12 are deficient in production of interferon-gamma. *J Leukoc Biol* **83**, 1267-1276 (2008).
29. Tassi I, *et al.* NK cell-activating receptors require PKC-theta for sustained signaling, transcriptional activation, and IFN-gamma secretion. *Blood* **112**, 4109-4116 (2008).
30. Gao Y, *et al.* Control of T Helper 2 Responses by Transcription Factor IRF4-Dependent Dendritic Cells. *Immunity* **39**, 722-732 (2013).
31. Halim Timotheus YF, *et al.* Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Critical for the Initiation of Adaptive T Helper 2 Cell-Mediated Allergic Lung Inflammation. *Immunity* **40**, 425-435 (2014).
32. Tourdot S, *et al.* Efficacy of sublingual vectorized recombinant Bet v 1a in a mouse model of birch pollen allergic asthma. *Vaccine* **31**, 2628-2637 (2013).

Figure legends

Figure 1. ILC2 cells producing IL-5 and IL-13 were required for the induction of allergic lung inflammation in PKC- $\theta^{-/-}$ mice.

WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice were treated with HDM extract (a). Extracellular staining on lung mononuclear cells of CD45, Lin, Sca1, IL-33R and c-kit (CD117) was followed by intracellular staining of IL-5 and IL-13. Representative dot plots (b, d) and scatter plot (c, e). Representative data of two independent experiments are given (n=4 to 8 mice per group). **P \leq 0.01; *** P \leq 0.001.

Figure 2. Impaired Th2-mediated lung inflammation in PKC- $\theta^{-/-}$ mice

WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice were treated with HDM extracts. Total cells, eosinophils and lymphocytes recruitment in BALF (a-b, d), eosinophil peroxidase activity (EPO) in the lung (c), airway resistance (e), staining (magnification: x 20) and semi-quantitative histological score (f-h), Muc5ac gene expression (i). These experiments were performed three time (n= 8 mice per group). Values are the mean \pm s.e.m. n.s., not significant, *P \leq 0.05; **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001.

Figure 3. Th2 associated cytokines and chemokines analysis in lung homogenates of PKC- $\theta^{-/-}$ mice.

IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-12, IL-13, IL-33, IFN γ , CXCL1 (KC), CCL11, CCL17 (TARC), CCL20 (MIP-3 α), and CCL24 (Eotaxin-2) (a-l) levels in lung homogenates of WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice by ELISA. *IRF4* gene expression and NFAT1 (NFATc2) protein

expression in lung homogenates (m-n). Values are the mean \pm s.e.m. of 4 to 8 mice per group *P \leq 0.05; **P \leq 0.01.

Figure 4. Reduced pulmonary recruitment of Treg cells (Foxp3⁺TCR β ⁺) in the absence of PKC- θ .

CD45, CD3, TCR β and Foxp3 on lung mononuclear cells. Representative dot plots (a, b, e), the absolute numbers and the frequency of CD45⁺CD3e⁺ (c, d) TCR β ⁺ Foxp3⁺ cells (f,g). These experiments were performed twice. Values are the mean \pm s.e.m. of 4 to 8 mice per group. *P \leq 0.05; ** P \leq 0.01.

Figure 5. Antigen uptake and processing and HDM activated DCs promote T-cells proliferation of naive CD4⁺ T cells from PKC

In vitro antigen uptake and processing on BMDC from WT and PKC- θ ^{-/-} mice (a, b). MFI of OVA-FITC (a), OVA-DQ (b) and MHCII⁺ DCs (c). IL-1 α , IL-1 β and IL-10 levels in DC culture supernatant (d-f). CFSE labeled CD4⁺ T cells from naive WT or PKC- θ mice were cocultured with untreated or HDM-treated DCs at a ratio of 1:10 (T cells:DCs) for 3 days (g). IL-2 levels in the supernatant (h). Data are representative of two independent experiments (n = 5). Data are presented as mean \pm s.e.m. . n.s., not significant, * P \leq 0.05; ** P \leq 0.01; *** P \leq 0.001.

Figure 6. Oral administration of PKC- θ inhibitor (C20) reduces HDM-driven inflammation, airway hyper-responsiveness and *IRF4* gene expression

WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice were treated as described (a). Total cells, eosinophils and lymphocytes recruitment in BALF (b, c, e), EPO activity in the lung (d), airway resistance (f), cell infiltration and mucus production using PAS staining (magnification: x 20) and semi-quantitative histological score (g-i), Muc5ac gene expression (j). IL-1 α , IL-1 β , IL-33, CCL11, CCL17 (TARC), and CCL24 (Eotaxin-2) (k-p) levels in lung homogenates. *IRF4* gene transcription and NFAT1 (NFATc2) protein expression in lung homogenates (m-n) n.s., not significant, *P \leq 0.05; **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001.

Figure 1

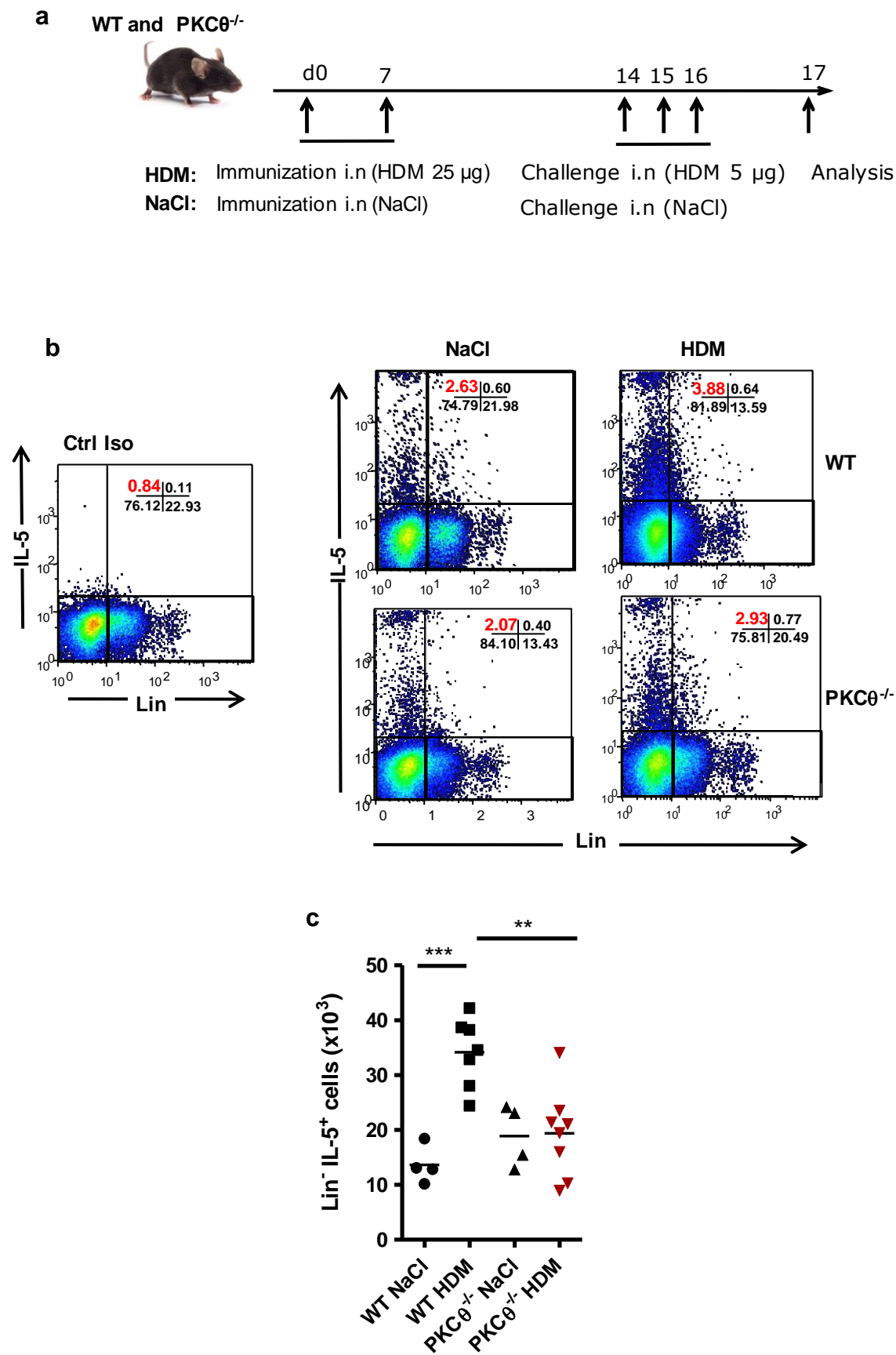


Figure 1

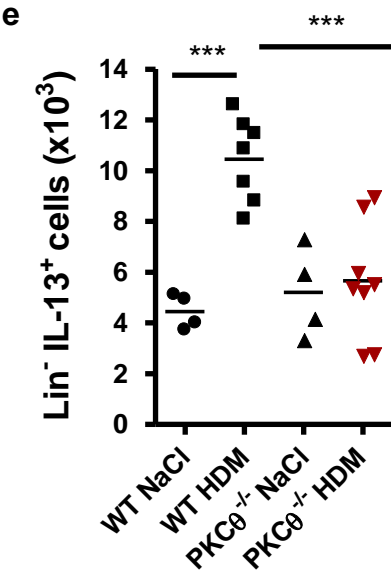
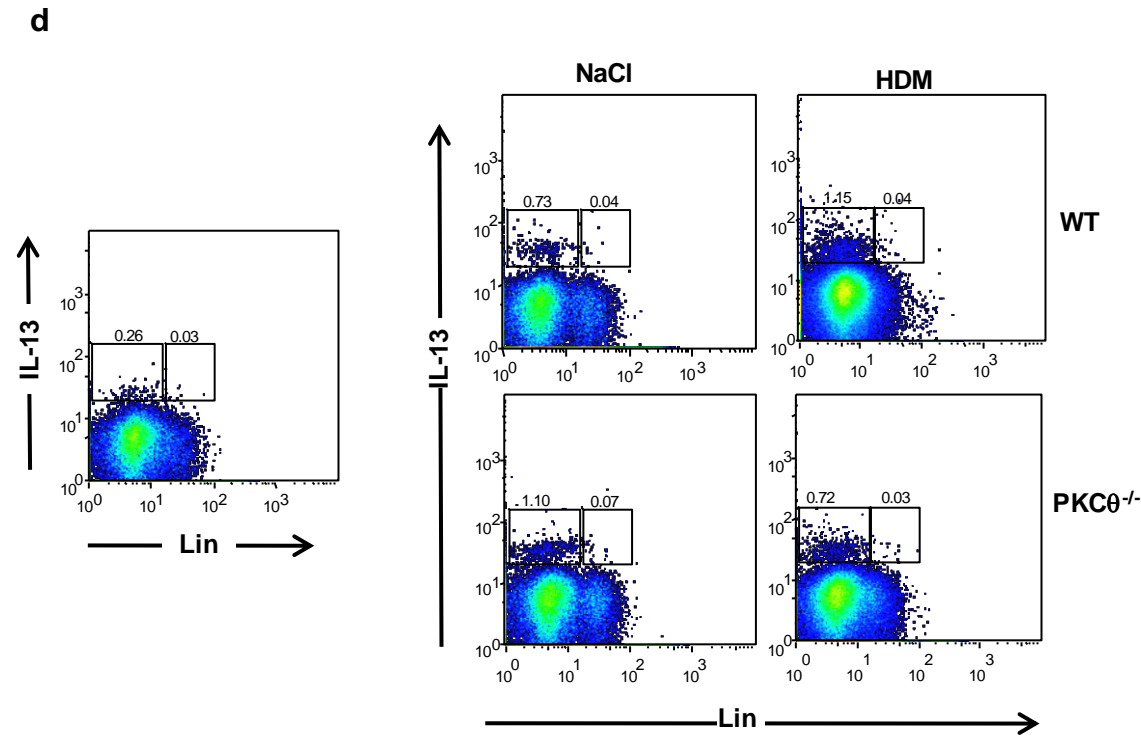


Figure 2

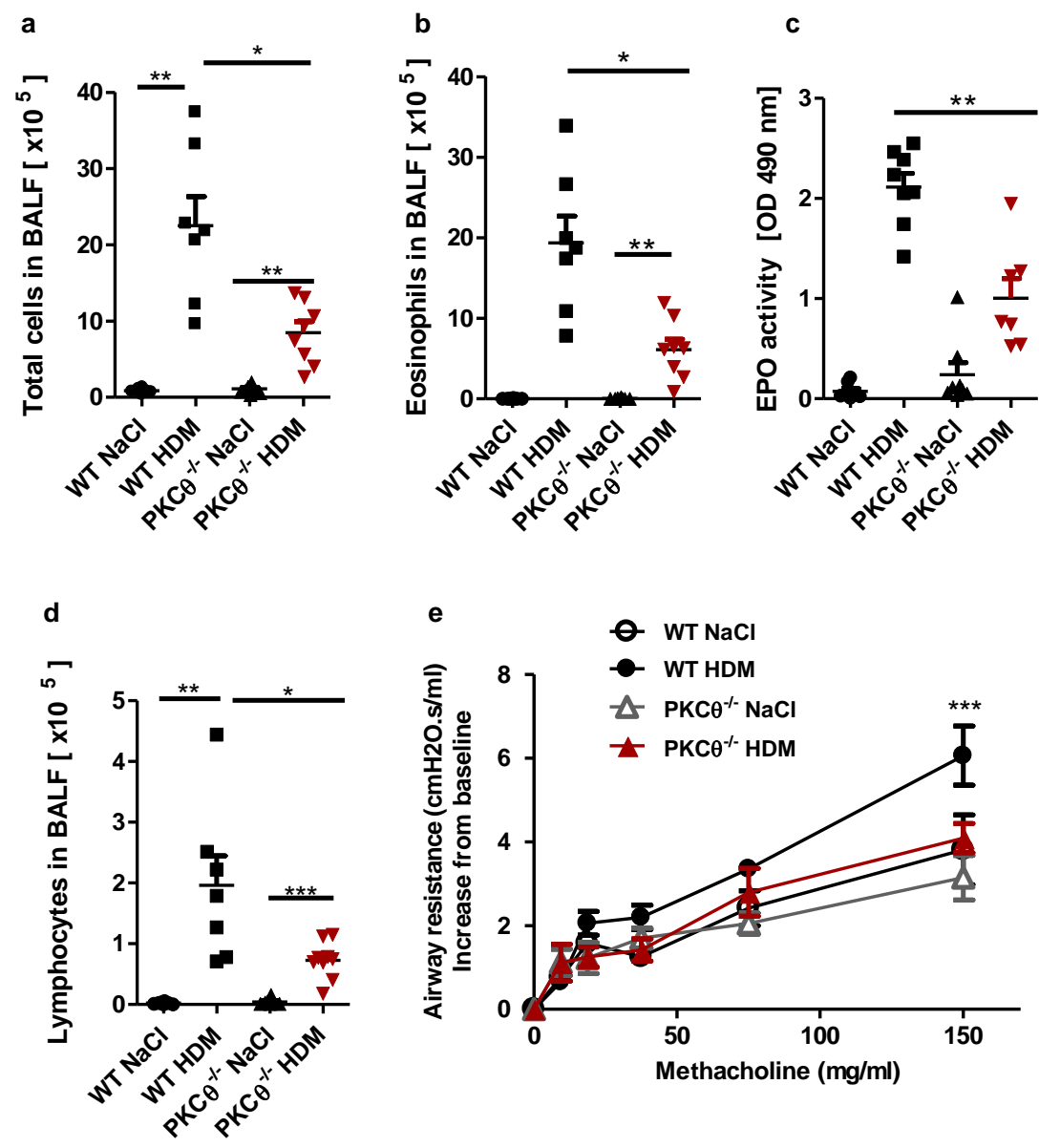


Figure 2

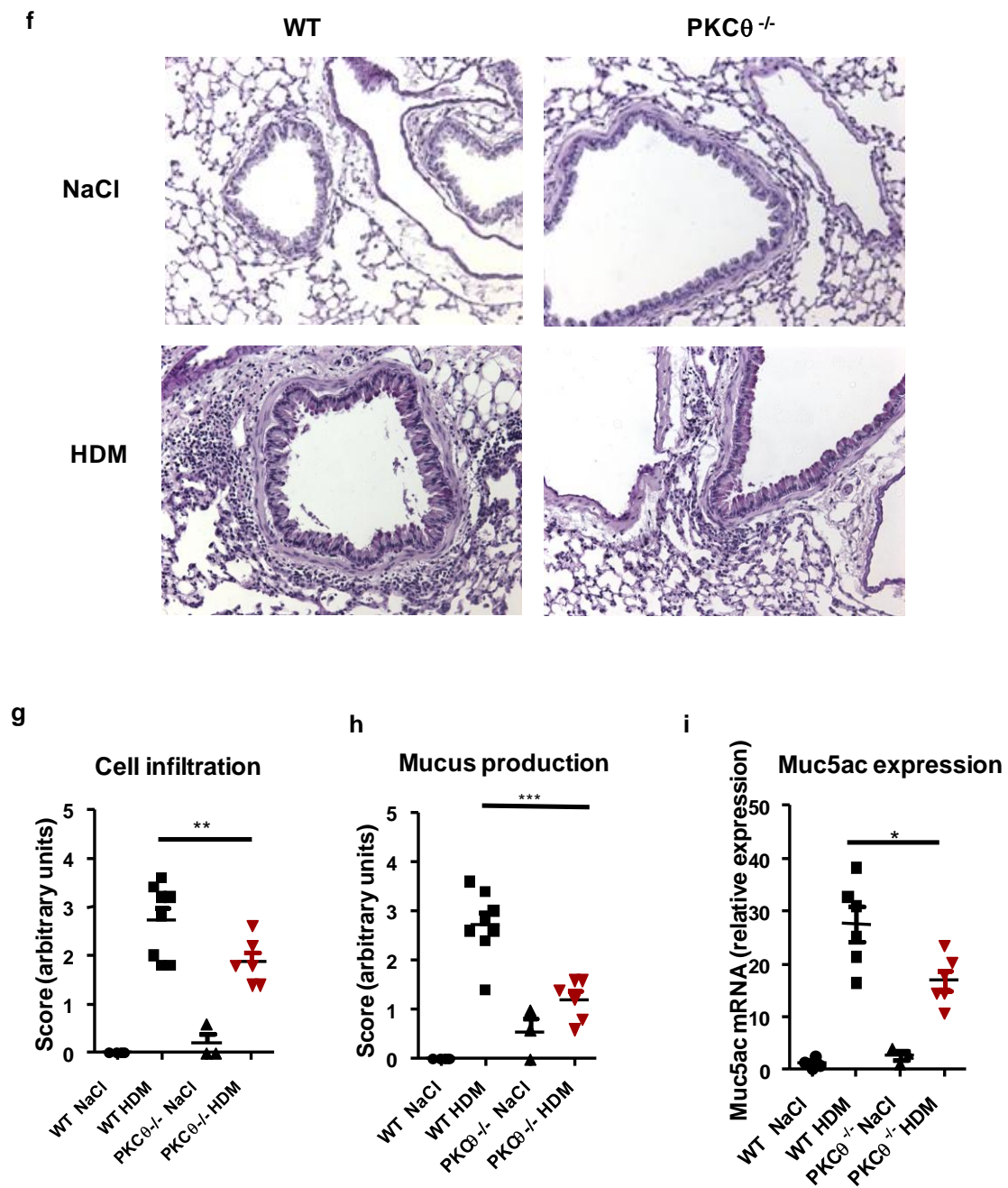


Figure 3

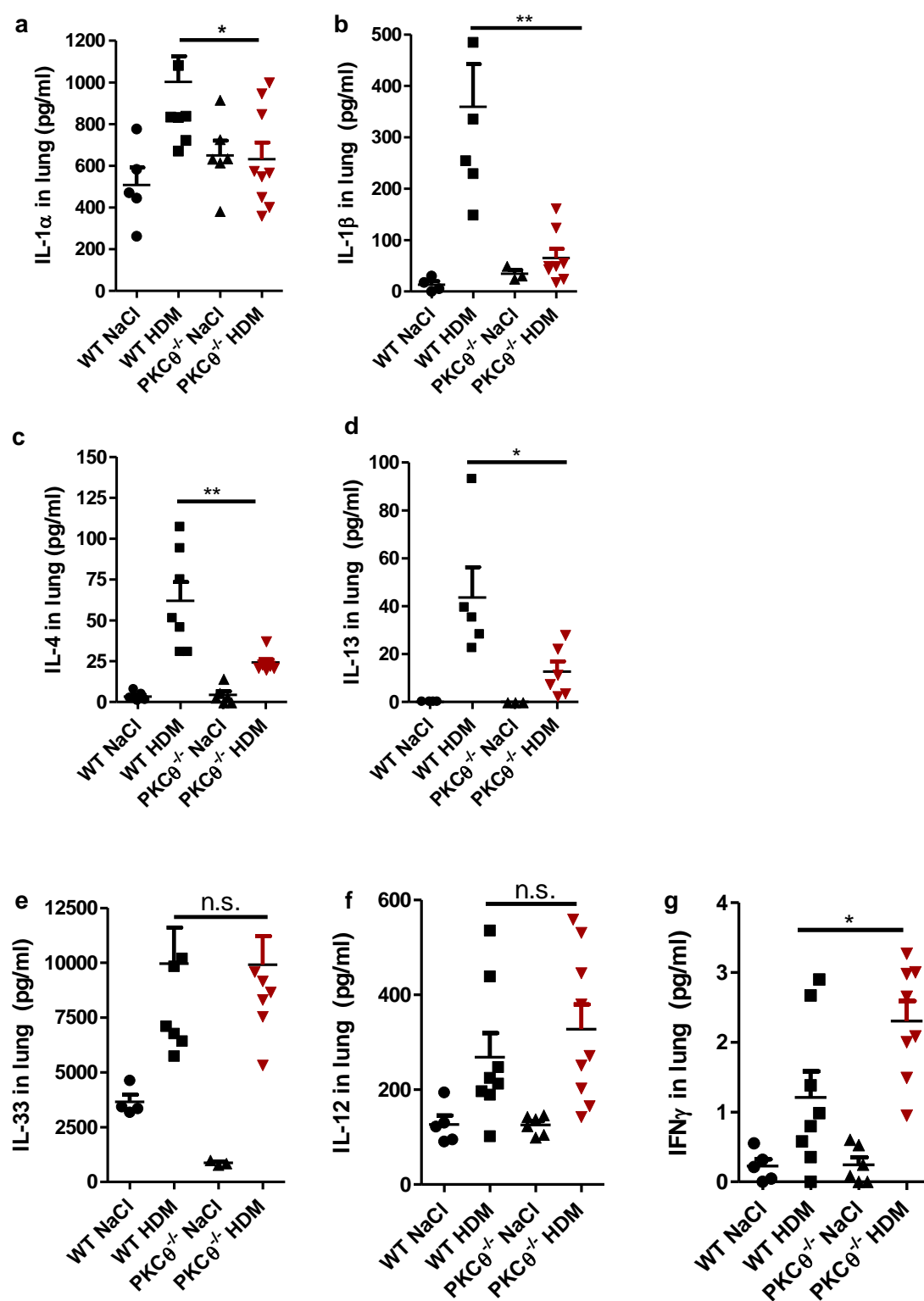


Figure 3

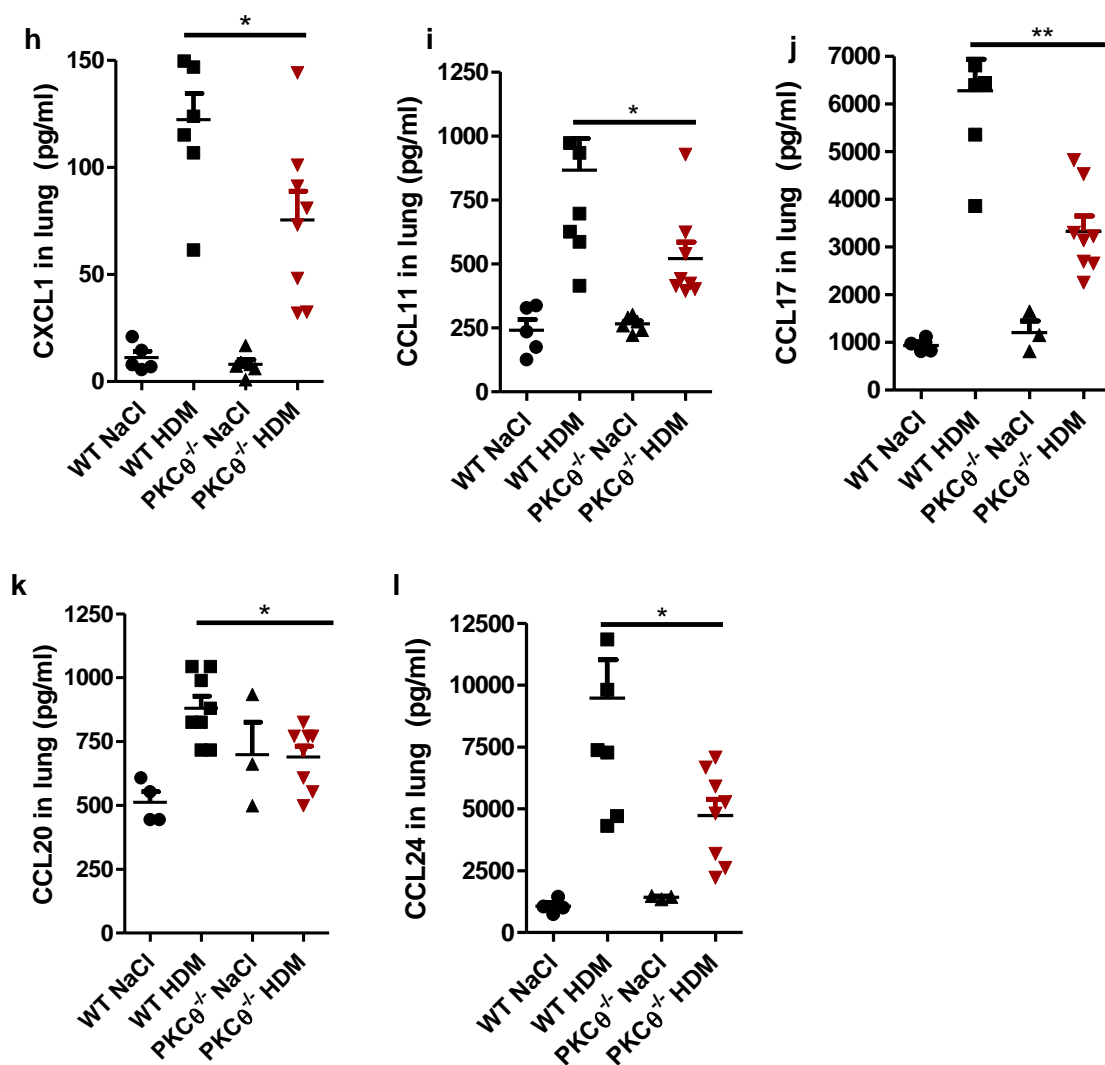


Figure 3

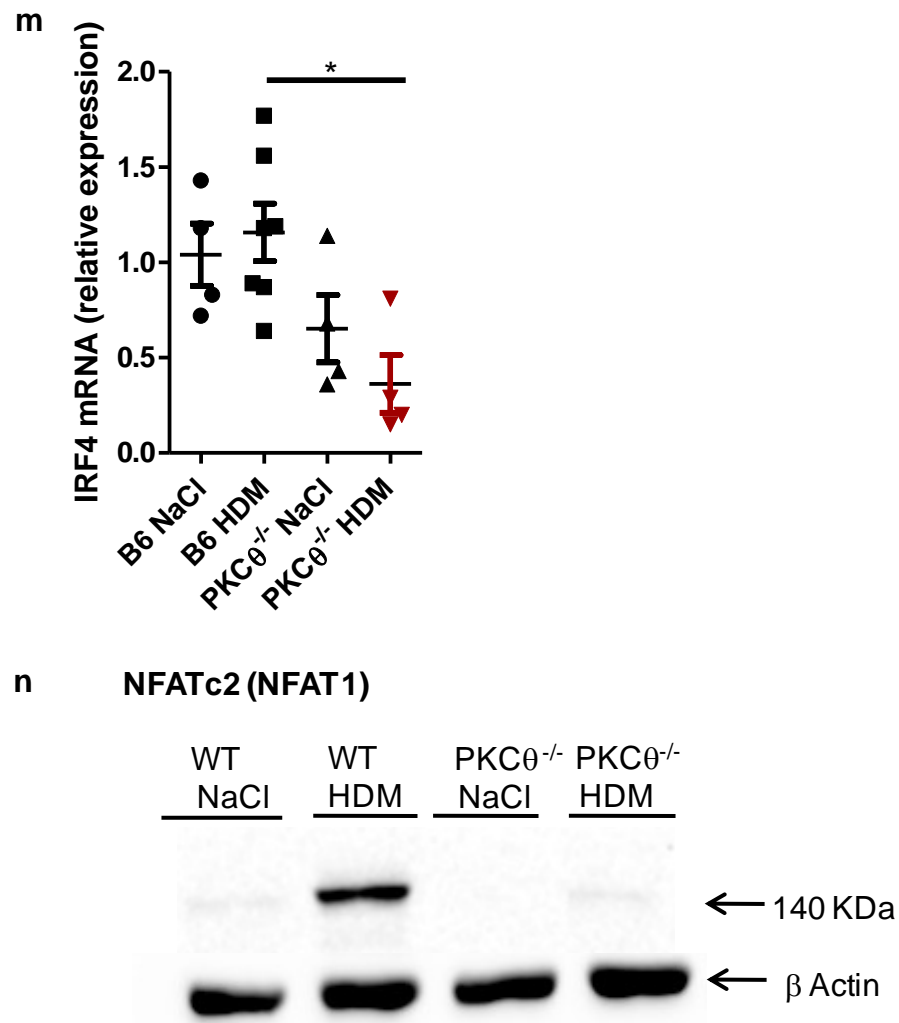


Figure 4

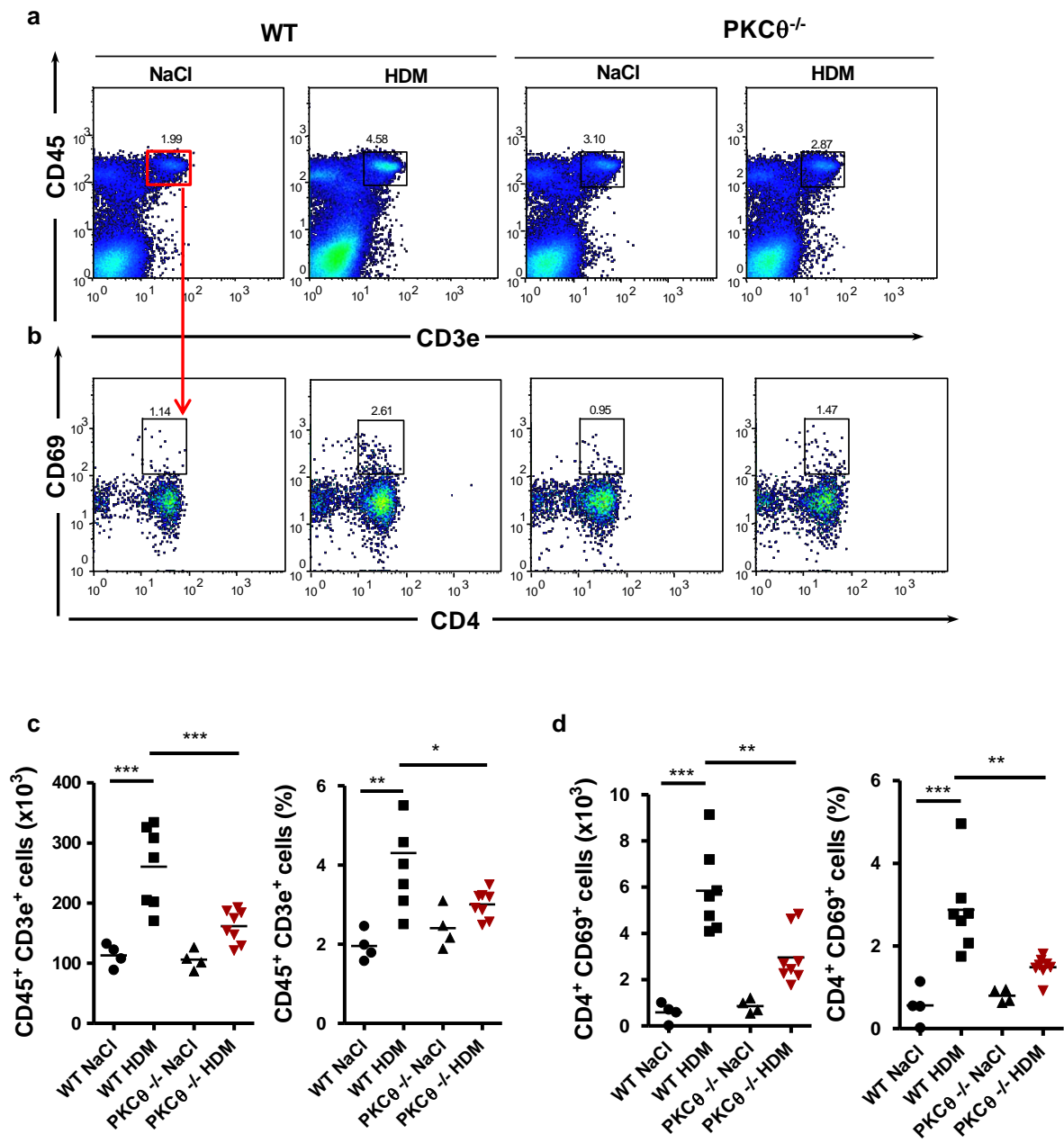
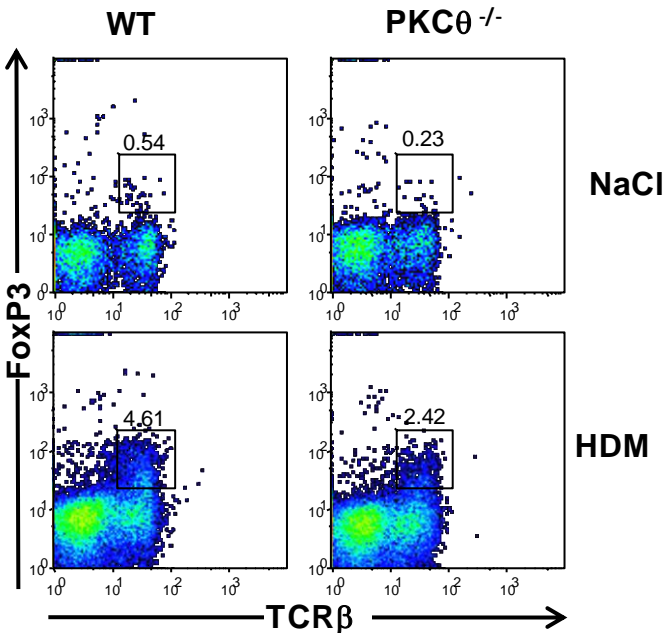
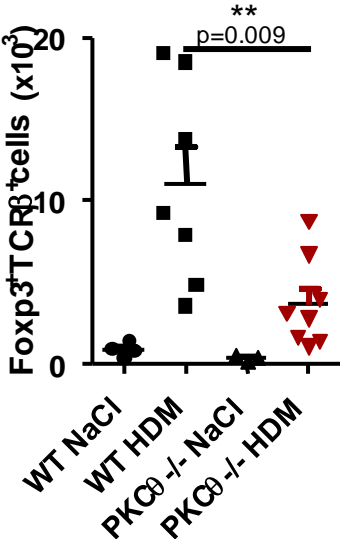


Figure 4

e



f



g

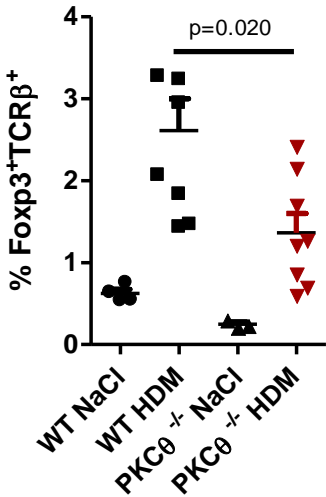


Figure 5

■ WT
■ PKC $\theta^{-/-}$

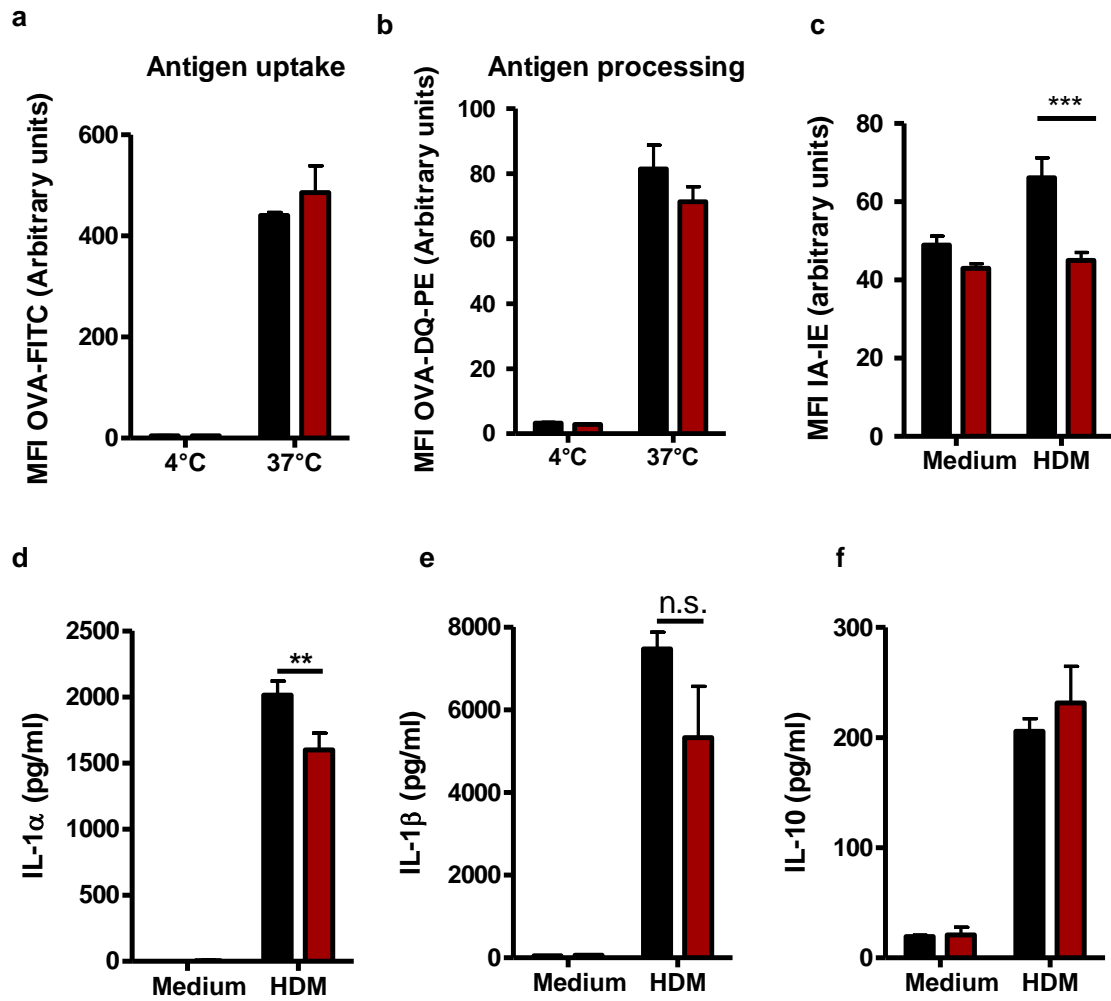


Figure 5

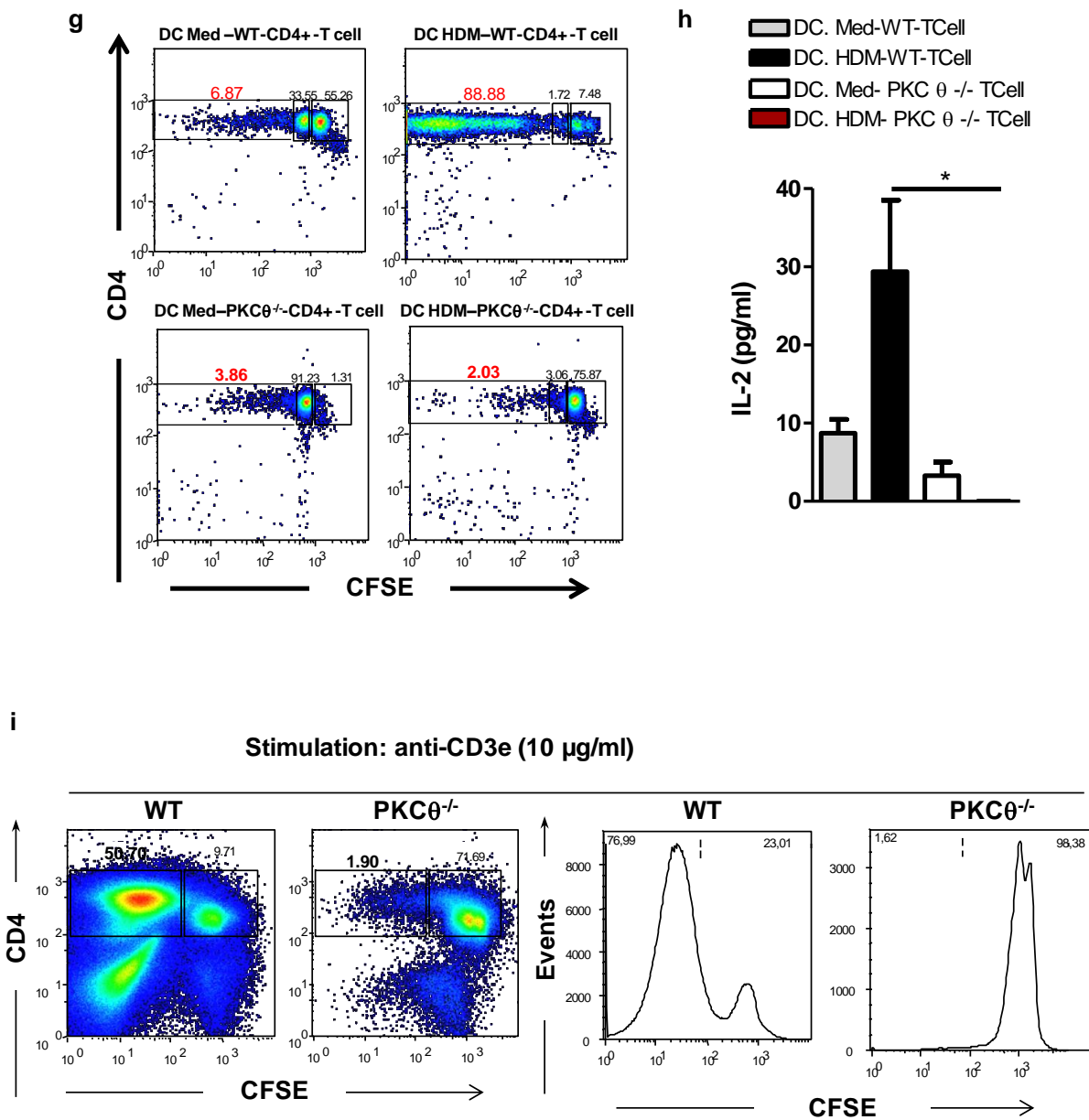


Figure 6

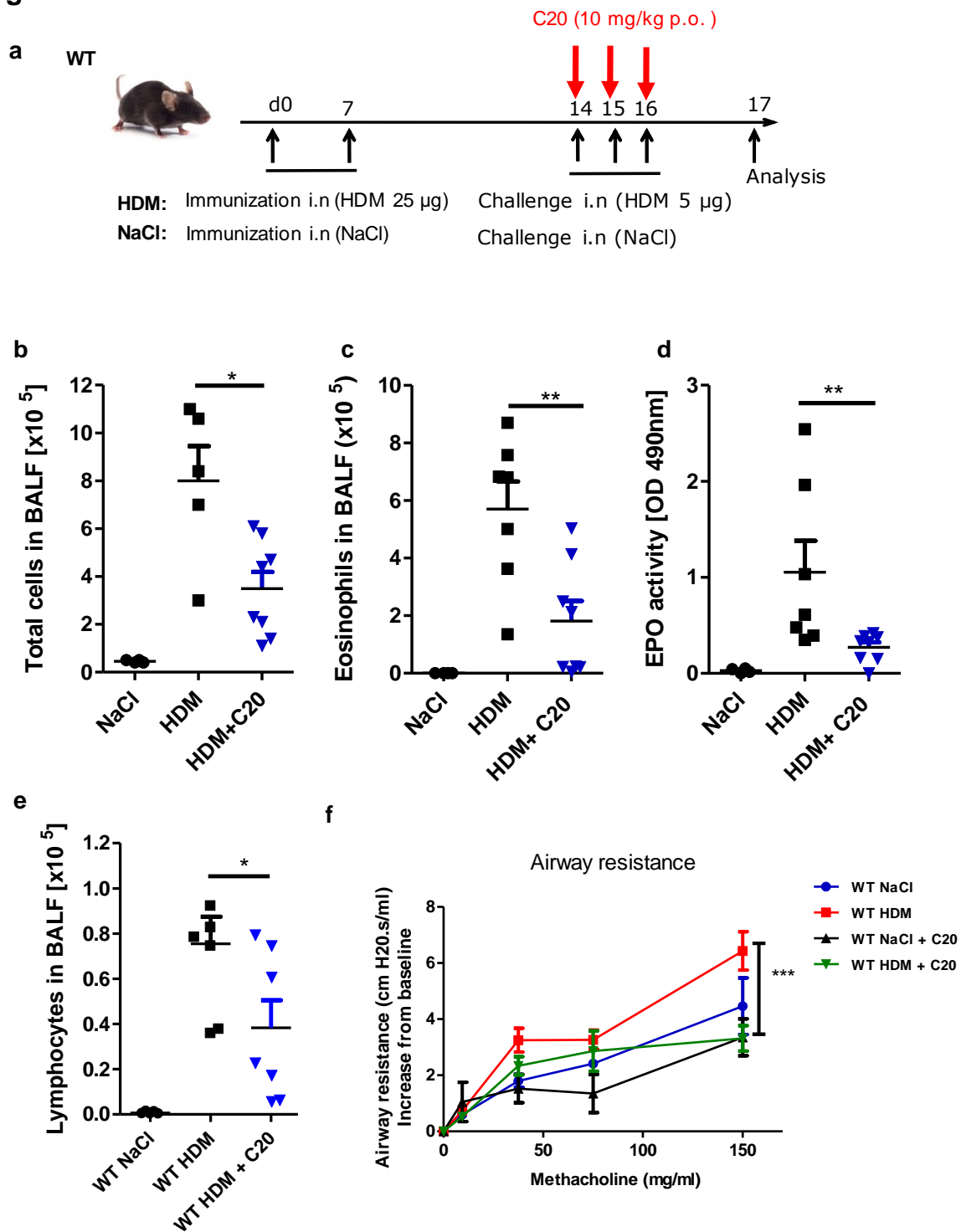


Figure 6

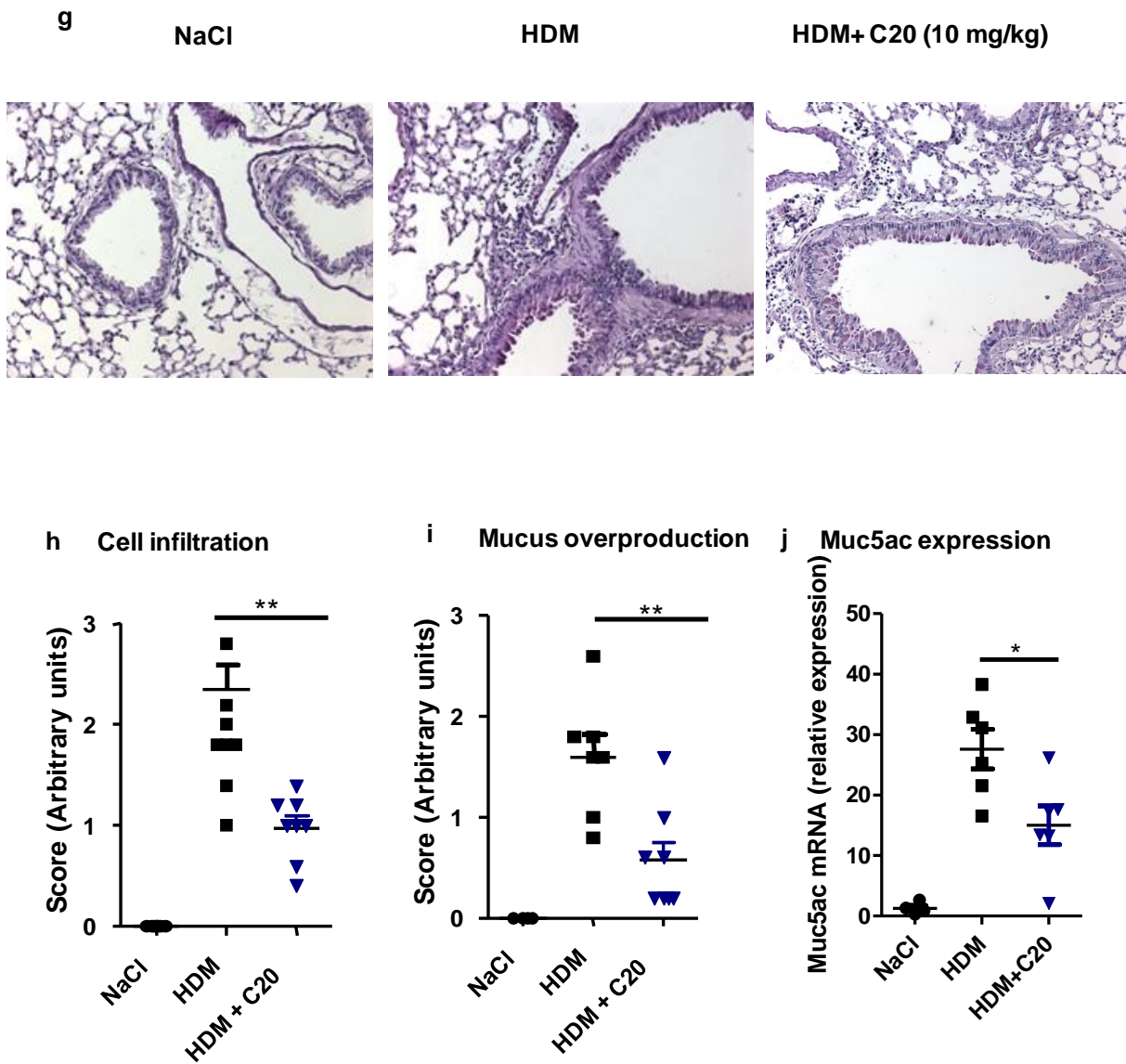


Figure 6

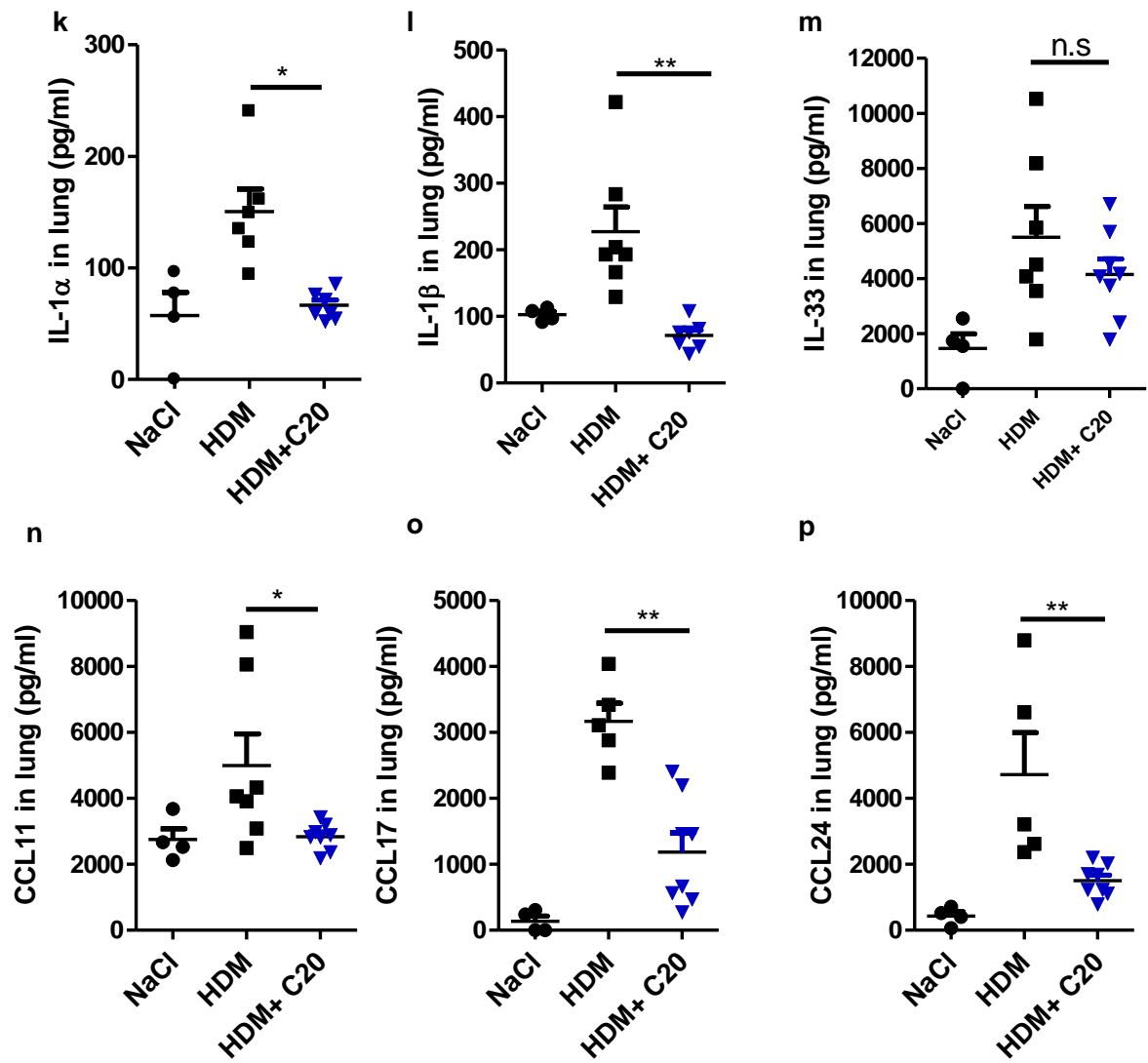
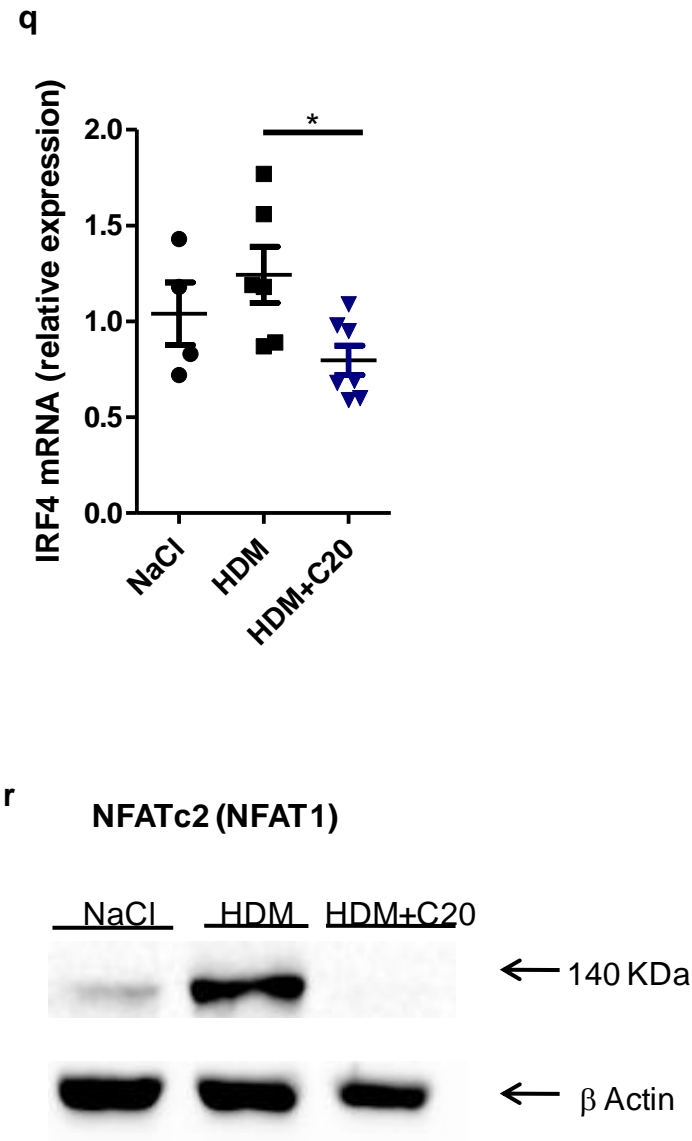


Figure 6



PKC theta controls ILC2 and Th2 responses to house dust mite allergen by inhibiting NFAT1 and IRF4

Fahima Madouri¹, Louis Fauconnier², Pauline Chenuet¹, Margaux Gallerand², Tiffany Marchiol², Nathalie Rouxel², Aurélie Ledru², François Erard¹, Fabrice Trovero², Valérie F.J. Quesniaux¹, Bernhard Ryffel^{1,*} & Dieudonnée Togbe^{2*}.

¹ Laboratory of experimental and molecular immunology and neurogenetics (INEM), UMR 7355 CNRS-University of Orleans, 3B, rue de la Ferrollerie, F-45071 Orleans-Cedex2, France, University of Orleans

² Artimmune SAS, 13 Avenue Buffon, 45100-Orléans, France

SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUPPLEMENTAL METHODS

BP induced allergic airway inflammation induction

Isoflurane anesthetized mice were administered intranasally twice at days 0 and 14 with 10 µg Bet v1 (Stallergènes, France)(Tourdot, Airouche et al. 2013) without adjuvant, control mice were challenged with saline alone and were challenged on days 21-24 with 10 µg of Bet v1.

Twenty four hours after the last challenge, mice were sacrificed; bronchoalveolar lavage (BAL) and lung were collected for EPO enzyme, cytokines, chemokines, histology, qPCR and airway hyperreactivity and Western blot analysis.

Supplementary legends

Supplementary figure 1: *Impaired IL-4⁺TCR β ⁺ cells and IL-5⁺TCR β ⁺ cells in absence of PKC- θ .*

HDM sensitized WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice were challenged three times with HDM extracts. Twenty hours after the third HDM challenge, lung mononuclear cells from WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice were isolated and restimulated for 4 h with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml) in presence of Brefeldine A followed by extracellular staining of NK1.1, CD45, TCR β , CD4 and CD8 α and intracellular staining of IL-4 (a-c) or IL-5 (d-f). Representative dot plots (a, d) and scatter plot are shown (b-c, e-f). Values are the mean \pm s.e.m. of 4 to 8 mice per group. *P \leq 0.05; **P \leq 0.01. n.s., not significant

Supplementary figure 2: *Impaired NK1.1⁺TCR β ⁻ cells in spleen in absence of PKC- θ and but similar CD45⁺NKp46⁺ cells.*

HDM sensitized WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice were challenged three times with HDM extracts. Twenty hours after the third HDM challenge, lung mononuclear cells from WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice were isolated and restimulated for 4 h with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml) in presence of Brefeldine A followed by extracellular staining of CD45, NKp46 (a-c). Twenty hours after the third HDM challenge, spleen cells from WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice were isolated, followed by extracellular staining of NK1.1, TCR β (d-e). Representative dot plots (a, d) and scatter plot are shown (b-c,

e). Values are the mean \pm s.e.m. of 4 to 8 mice per group. ** $P \leq 0.01$. n.s. not significant.

Supplementary figure 3: *PKC- θ* inhibitor (C20) reduces birch pollen-driven inflammation and airway hyper-responsiveness.

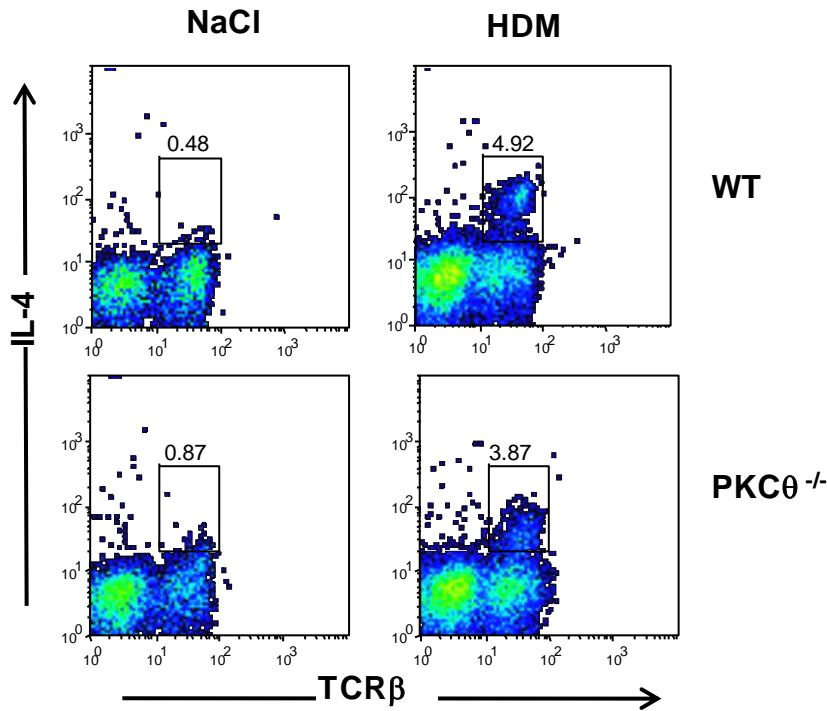
BP sensitized WT mice were challenged four times with BP. A dose of 10 mg/kg of C20 is administrated *per os* during challenge (a). Twenty four hours after the last BP challenge, differential cell counts were determined in BALF (b). Eosinophil and lymphocytes counts were analyzed in BALF (c-d). Airway resistance was evaluated (e). Tissue inflammation and histology score in BP sensitized and challenged WT-HDM and WT-BP+C20 mice was evaluate 24h following the last challenge using periodic acid shift PAS staining for goblet cells (magnification: x 20) (f). A semi-quantitative histological score of cell infiltration and mucus hypersecretion was evaluated on an arbitrary scale from 0 to 5 by two independent observers (g-h). IL-1 α , IL-1 β , IL-13, IL-33, CCL17 (TARC), CCL20 (Eotaxin) and CCL24 (Eotaxin-2) (i-o) levels in lung homogenates of WT and PKC- $\theta^{-/-}$ mice were measured by ELISA. NFAT1 (NFATc2) expression was evaluated by Western-Blot (p). These experiments were performed two time (n= 6 mice per group). Representative data of two independent experiments are shown. Values are the mean \pm s.e.m. of 4 to 6 mice per group. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$

REFERENCES

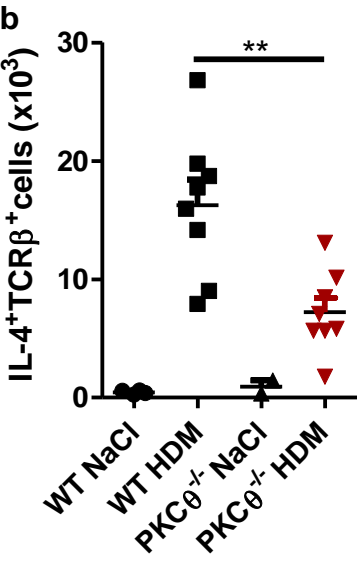
- 1 Tourdot, S. *et al.* Efficacy of sublingual vectorized recombinant Bet v 1a in a mouse model of birch pollen allergic asthma. *Vaccine* **31**, 2628-2637, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.041> (2013).

Supplemental figure 1

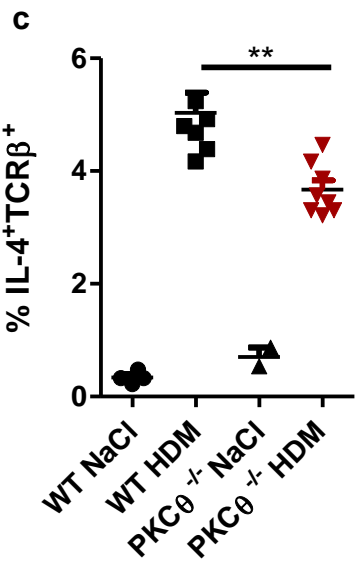
a



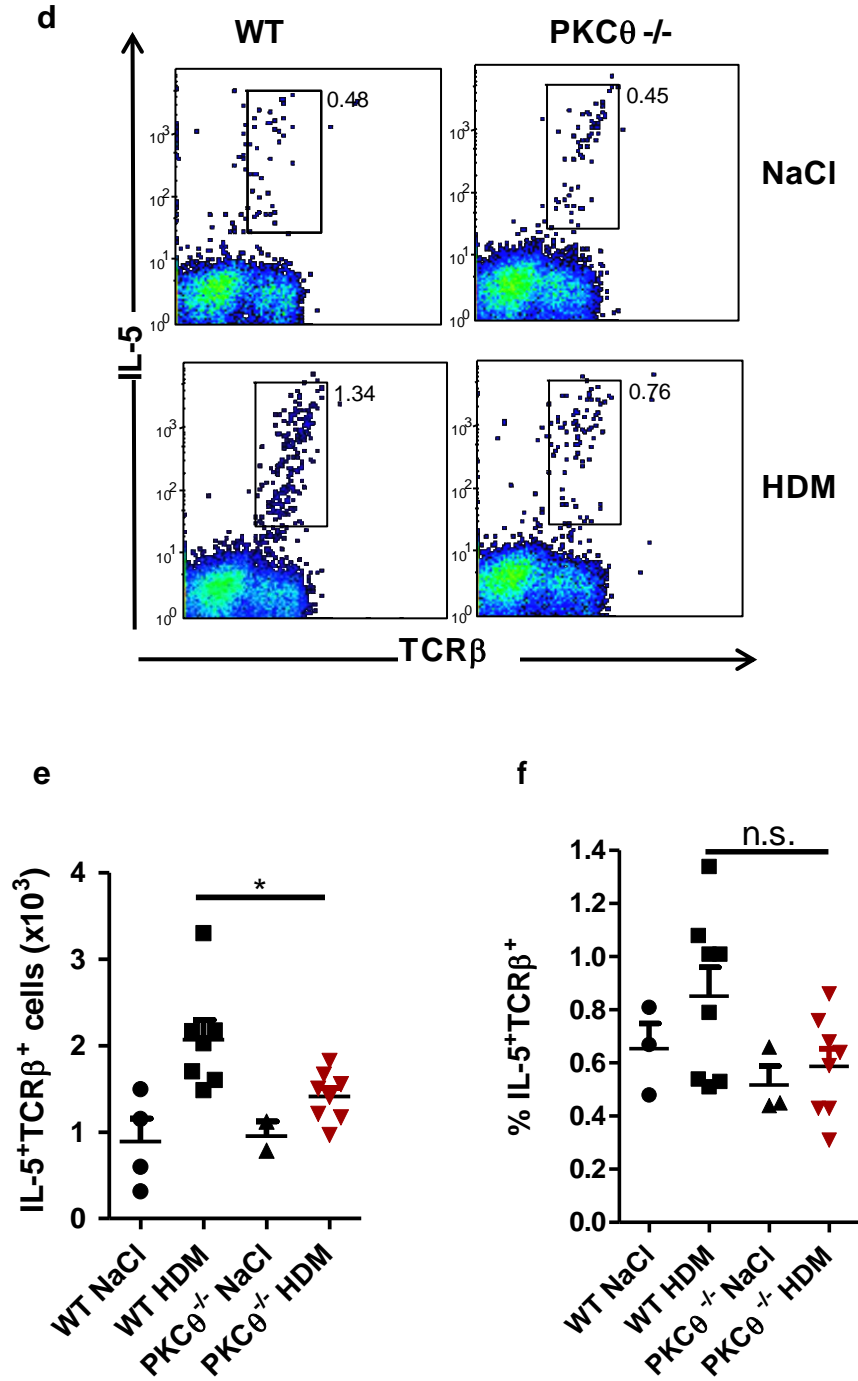
b



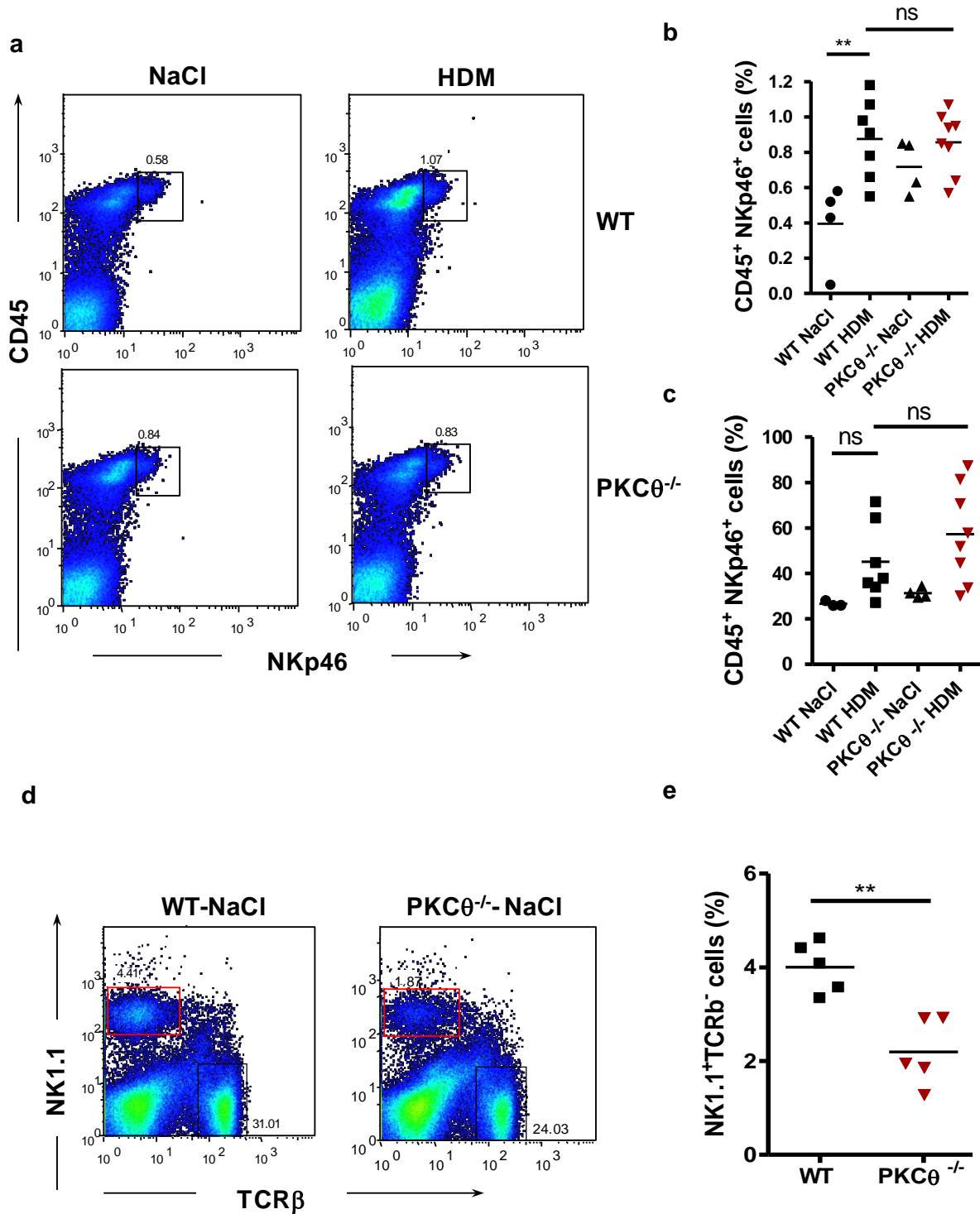
c



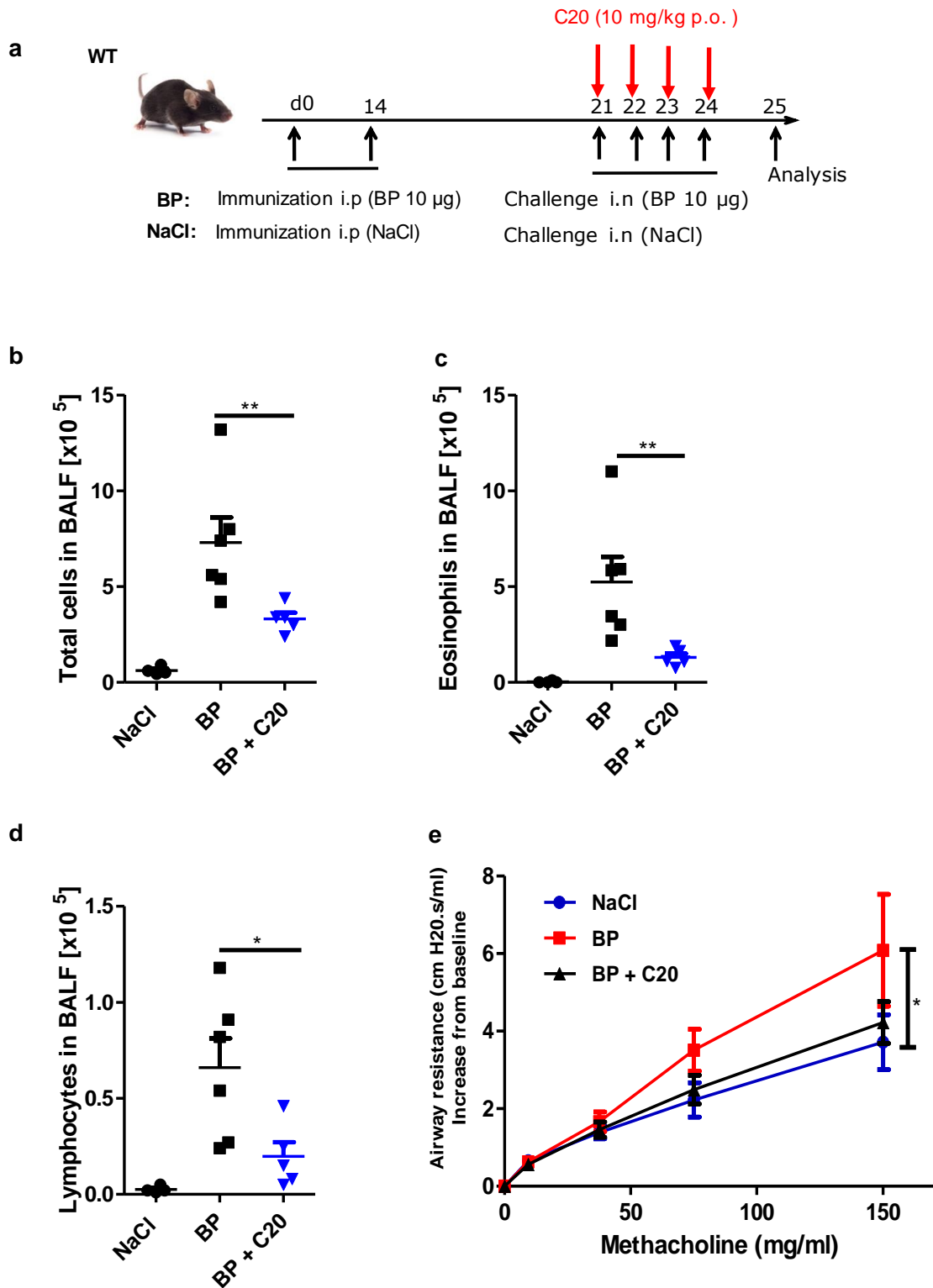
Supplemental figure 1



Supplemental figure 2

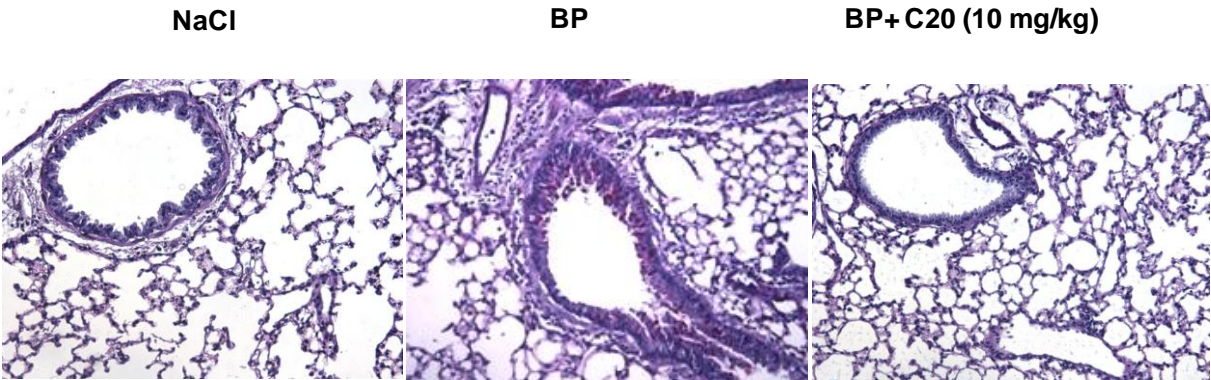


Supplemental figure 3

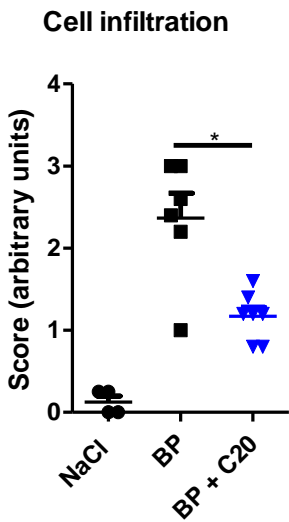


Supplemental figure 3

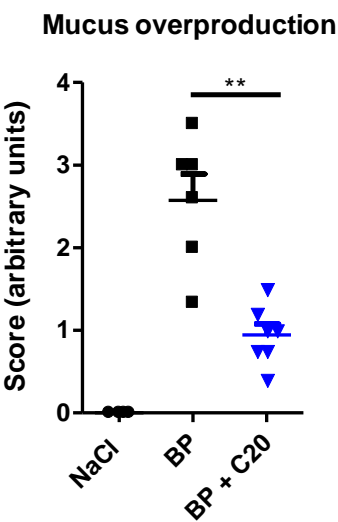
f



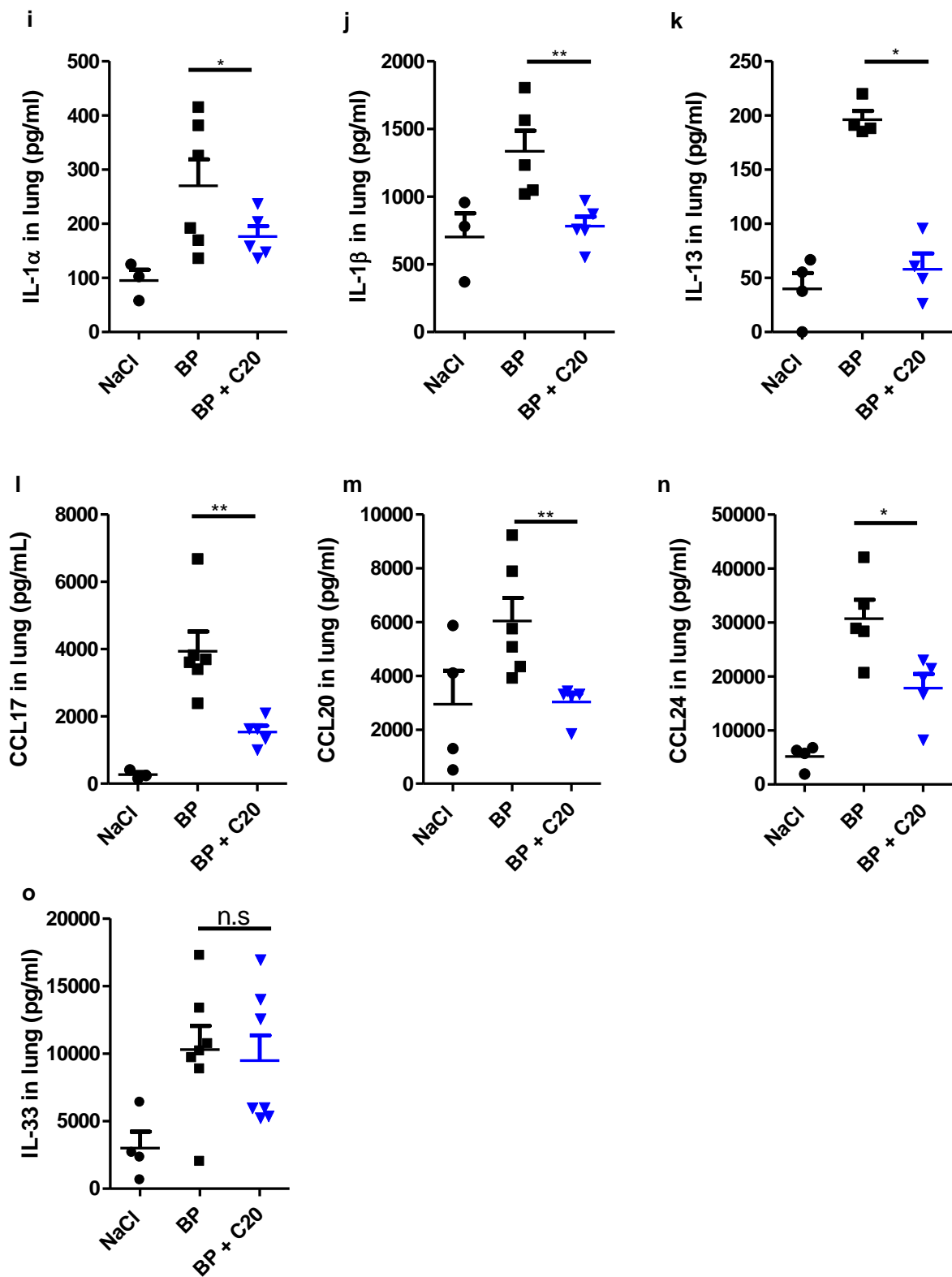
g



h



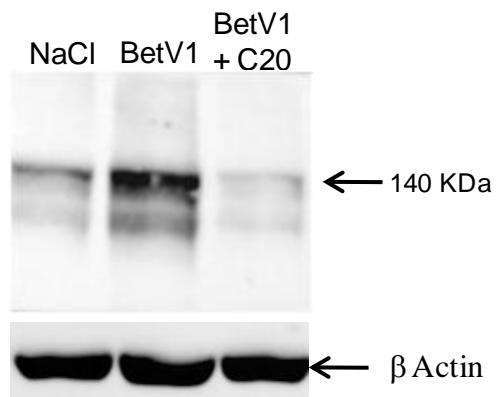
Supplemental figure 3



Supplemental figure 3

p

NFATc2 (NFAT1)



DISCUSSION

L'une des grandes découvertes en immunologie est celle des inflammasomes, il y a une décennie (Martinon, Burns et al. 2002). Ces complexes multiprotéiques sont des piliers dans la régulation de l'inflammation et le plus étudié est l'inflammasome NLRP3. Celui-ci est capable de détecter des motifs spécifiques aux pathogènes (PAMP), des cristaux, des toxines bactériennes ou des molécules du soi, qui en situation de stress ou d'endommagement cellulaires sont libérés dans le milieu extracellulaire en tant que signaux de dangers endogènes (DAMP). La reconnaissance de ces activateurs permet l'assemblage des protéines composant l'inflammasome. Le domaine PYD des inflammasomes NLRP recrute la protéine adaptatrice ASC. Cette protéine contient un domaine PYD en N-terminal (reconnu par l'inflammasome) et un domaine CARD en C-terminal. Celui-ci s'associe au domaine CARD de la caspase-1 et entraîne son activation (Martinon, Mayor et al. 2009). La caspase-1 est une cystéine protéase dont le rôle dans la mort cellulaire et dans l'activation des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et l'IL-18 (synthétisées sous forme de précurseurs inactifs dans le cytosol), a beaucoup été étudié dans des expériences *in vivo* et *in vitro* (Li, Allen et al. 1995) (Dai, Sayama et al. 2011), d'où sa nomination ICE pour « Interleukin-1 Converting Enzyme ».

L'un des projets de ma thèse est porté sur les mécanismes impliquant NLRP3 et la caspase-1 dans l'asthme allergique aux allergènes d'acariens HDM. Au total, mon travail de thèse a permis de montrer *in vivo* l'implication de la caspase-1 non seulement dans la réponse inflammatoire pulmonaire mais aussi dans la production d'IL-1 β et sur la régulation de l'IL-33. Cependant, le mécanisme et les conséquences biologiques de l'action de la caspase-1 sur la production d'IL-33 ne sont pas encore connus. C'est pourquoi nous proposons un mécanisme permettant d'expliquer nos résultats.

L'activation de la caspase-1 par l'inflammasome NLRP3 inhibe l'inflammation pulmonaire dépendante de l'IL-33 induite par l'allergène d'acarien HDM

Mon travail de thèse s'inscrit dans un vaste projet entrepris au laboratoire il y a plusieurs années et visant à caractériser le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans différents modèles de pathologies respiratoires. Je me suis également intéressée au rôle d'une protéase : la caspase-1. Au laboratoire l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans la réponse inflammatoire allergique en absence d'adjuvant avait été démontré (Besnard, Guillou et al. 2011). En effet, les souris déficientes pour NLRP3 présentent une réponse réduite à l'ovalbumine, qui s'explique par un défaut d'activation et de migration des cellules dendritiques des ganglions drainants vers les poumons. Notre étude a mis en évidence un rôle régulateur essentiel de NLRP3 et de la caspase-1 sur la réponse Th2. En effet, nous

démontrons que les souris déficientes pour NLRP3 ou pour la caspase-1 présentent une forte augmentation des caractéristiques de l'asthme en réponse à HDM par rapport aux souris sauvages (augmentation de l'éosinophilie, de la résistance respiratoire, de la production de cytokines et chimiokines Th2 et de la production de mucus dans les poumons). Les phénotypes obtenus sont différents entre les deux modèles (ovalbumine et HDM). En effet, ces deux allergènes présentent des caractéristiques différentes en termes d'antigénicité puisque l'ovalbumine ne cause pas d'allergie sans immunisation préalable alors que HDM est allergénique par lui-même en exposition directe.

De nombreux articles suggèrent un rôle critique de NLRP3 et de ses produits, dont la caspase-1, dans l'inflammation pulmonaire observée chez les patients asthmatiques. Le taux d'ATP, un activateur de NLRP3, libéré par les cellules épithéliales, les cellules dendritiques et les macrophages est augmenté en réponse à des provocations par des allergènes tels que HDM (Birrell and Eltom 2011). De plus, une équipe a montré que l'expression des gènes codant pour NLRP3 et pour la caspase-1 sont significativement élevées dans les expectorations des patients atteints d'asthme neutrophilique (Simpson, Phipps et al. 2014). Il a également été montré que les cytokines liées à l'inflammasome, à savoir l'IL-1 β et l'IL-18, activées par la caspase-1, jouent un rôle dans l'asthme allergique. En effet, les taux de ces cytokines pro-inflammatoires sont augmentés dans le sérum des patients allergiques ou dans les poumons de souris traitées avec HDM (Birrell and Eltom 2011) ce qui confirme mes résultats.

L'allergène d'acarien administré aux souris lors de ces travaux est un mélange d'extrait d'acarien composé de protéases Der p 1, une cystéine protéase (papain-like) et Der p 9, une sérine protéase à l'activité collagénolytique (Gregory and Lloyd 2011). Ces deux molécules sont responsables de la rupture des jonctions serrées, de la production de cytokines (IL-33, IL-25, TSLP), chimiokines (CCL2, CCL20) et facteurs de croissance (GM-CSF), de la dégranulation des éosinophiles et des mastocytes, de la maturation des fibroblastes et de la production de collagène. En plus de contenir des protéases, les allergènes d'acariens contiennent la protéine Der p 7 structurellement homologue à la protéine de liaison des lipides. Dans cette mixture se trouve également Der p 2, l'isoforme majeur contenu dans l'extrait de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Bordas-Le Floch, Bussières et al. 2012), qui est structurellement similaire aux molécules de signalisation MD2 du complexe TLR4. Ceci facilite l'activation de TLR4 et des cellules dendritiques ainsi que l'initiation d'une réponse Th2 (Hammad, Chieppa et al. 2009; Hammad, Plantinga et al. 2010). En effet, lorsque l'allergène entre en contact avec l'épithélium bronchique, première barrière de défense, il est reconnu par le TLR4, ce qui entraîne des dommages au niveau

des jonctions serrées des cellules épithéliales et permet la libération de cytokines telles que l'IL-25, l'IL-33, le TSLP et le GM-CSF. L'IL-33 est une cytokine de la famille de l'IL-1 capable d'induire une réponse de type Th2 dans diverses pathologies dont l'asthme allergique. Elle est stockée dans le noyau des cellules épithéliales et endothéliales et est immédiatement libérée dans l'espace extracellulaire sous forme non clivée et active (Full-Length) lors d'un dommage cellulaire pour agir en tant qu'alarmine comme l'IL-1 α (Lefrançois and Cayrol 2012). Elle alerte le système immunitaire inné d'un dommage tissulaire durant un trauma ou une infection. De plus, l'IL-33 a été identifié comme un gène de susceptibilité associé à l'asthme allergique chez l'homme dans les études d'association du génome (GWAS) (Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009). Elle peut également être libérée pendant l'apoptose où elle sera clivée par la caspase-1 qui la rend inactive (Cayrol and Girard 2009). Ainsi, l'augmentation de l'inflammation pulmonaire observée en absence de la caspase-1 s'explique par le fait que les protéases contenues dans l'extrait d'acarien HDM causent des dommages au niveau des cellules épithéliales, entraînant ainsi la libération de cytokines dont l'IL-33 et le GM-CSF. Les dosages de ces deux médiateurs dans les poumons des souris déficientes pour la caspase-1 traitées avec HDM montrent leur forte augmentation. Cependant, nous ne détectons pas d'IL-33 dans le lavage broncho-alvéolaire. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'elle n'est pas sécrétée ou que le kit ELISA utilisé ne permet pas de détecter les cytokines faiblement produites.

Le clivage et la sécrétion de l'IL-33 sont des événements complexes qui n'ont pas encore été clarifiés. Les différentes sources cellulaires de l'IL-33 peuvent expliquer les résultats contradictoires obtenus dans la littérature. Constitutivement exprimée dans les cellules endothéliales chez l'homme, les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses, l'IL-33 est aussi exprimée dans les macrophages activés. Des études ont montrées que l'expression d'IL-33 était augmentée dans les cellules épithéliales de patients asthmatiques (Préfontaine, Nadigel et al. 2010). La stimulation *in vitro* de cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) que nous avons réalisé révèlent la présence d'IL-33 dans le lysat cellulaire en réponse aux stimuli HDM. De plus, nous avons observé en cytométrie en flux que les macrophages pulmonaires étaient fortement recrutés chez les souris caspase-1^{-/-} après sensibilisation à HDM. La culture *in vitro* de macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) de ces souris et celle d'une lignée de monocytes humain (THP-1) montrent une augmentation significative de la production d'IL-33 en réponse à HDM.

A l'inverse de l'IL-1 β , la forme « Full-Length » de l'IL-33 est constitutivement exprimée, stockée dans le noyaux des cellules épithéliales et est biologiquement active. De plus, l'IL-33 est libérée sous sa forme entière lors d'un stress cellulaire (Lefrançois and

Cayrol 2012). Les taux d'IL-33 sont significativement plus élevés dans les poumons des souris déficientes pour la caspase-1 traitées avec HDM. Ainsi, nous démontrons que la caspase-1 inhibe l'expression de l'IL-33, ce qui atténue l'inflammation. La forme entière (full-length) de l'IL-33 ainsi que quelques formes clivées sont libérées dans les poumons des souris contrôles. Il ne s'agit pas d'une fixation non spécifique de l'anticorps secondaire car nous avons testé une incubation de la membrane avec cet anticorps seul et les pistes étaient vierges. Les clivages ont eu lieu avant le prélèvement des échantillons car les poumons ont été broyés dans un tampon contenant un cocktail anti-protéase. De plus, qu'il s'agisse de la forme entière ou des formes clivées, nous observons une augmentation très nette de la production d'IL-33 dans les poumons des souris traitées avec HDM. Il a été montré que l'exposition des cellules épithéliales pulmonaires à un allergène comme HDM induit la sécrétion d'ATP (Birrell and Eltom 2011), qui active les récepteurs P2 et une augmentation du taux de calcium intracellulaire. Ceci a pour conséquence d'une part, la translocation de l'IL-33 du noyau au cytoplasme puis à sa libération active et d'autre part, l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Kouzaki, Iijima et al. 2011). Nous montrons que la forme entière de l'IL-33 et les clivages de l'IL-33 sont augmentés dans les poumons des souris déficientes pour la caspase-1. Lors d'un dommage cellulaire, des neutrophiles sont recrutés au site de l'inflammation et sécrètent des protéases telles que l'élastase et la cathepsine G qui clivent l'IL-33 en différents sites, donnant différentes formes bioactives: IL-33₉₅₋₂₇₀, IL-33₉₉₋₂₇₀ et IL-33₁₀₉₋₂₇₀ (Lefrançois, Roga et al. 2012). Les formes clivées observées pourraient résulter de l'action de ces enzymes mais dans ce modèle d'asthme allergique induit par HDM, les neutrophiles sont recrutés en minorité dans les poumons par rapport aux éosinophiles et aux macrophages. Il serait intéressant d'étudier l'effet des protéases des éosinophiles dans le clivage du précurseur de l'IL-33 ou celui des enzymes protéolytiques libérées dans les poumons par les macrophages, les métalloélastases ou métalloprotéinases matricielles (MMP). En plus de la caspase-1, la caspase-8 et la calpaïne ne sont pas requises dans l'activation et la production de l'IL-33 par les macrophages, ce sont donc des protéases à exclure dans un mécanisme potentiel (Ohno, Oboki et al. 2009). De plus, il a été démontré que dans les macrophages humains et murins, la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-18 et d'IL-33 induite par l'hydroxyde d'aluminium (alum) est médiée par NLRP3 et sa protéine adaptatrice ASC et non l'inflammasome NLRC4 (Li, Willingham et al. 2008; Chen, Wang et al. 2011). Dans notre étude nous avons également exclu un rôle potentiel de NLRC4.

La caspase-1 est synthétisée dans le cytoplasme sous forme d'un précurseur inactif de 45 kDa qui sera clivé par l'inflammasome. La forme active est un tétramère de sous-unités de 10 et 20 kDa issues du clivage. Nous montrons la présence et l'augmentation de la sous-unité p20 dans les poumons des souris sauvages traitées avec HDM par rapport aux

contrôles. Cette forme est absente chez les souris caspase-1^{-/-}. Les animaux que nous utilisons sont bien déficients pour la caspase-1 mais pas seulement. En effet, les souris traitées durant ces expériences sont doubles déficientes caspase-1/11 (Kuida, Lippke et al. 1995). La caspase-11 est cruciale dans l'activation de la caspase-1 et dans la production d'IL-1 β par les macrophages. Cependant, contrairement à la caspase-1 qui est activée par l'inflammasome NLRP3 entre autre, la caspase-11 est activée de façon non-canonique (Kayagaki, Warming et al. 2011). Ainsi, l'implication de la caspase-11 n'est pas à exclure dans les résultats que nous avons obtenus.

L'IL-33 est le ligand du récepteur ST2. Deux variants de ce récepteur sont générés par épissage alternatif : une forme transmembranaire ST2L et une forme soluble sST2. Cette dernière forme soluble sert de leurre qui attire et piège l'IL-33, bloquant ainsi la voie IL-33/ST2 (Hayakawa, Hayakawa et al. 2007). Mes travaux ont montré que la neutralisation de l'IL-33 par l'administration de la protéine de fusion muST2-Fc à ces souris lors de la phase d'immunisation diminue les caractéristiques de l'asthme. Cette protéine de fusion joue le rôle de leurre du récepteur soluble ST2. Les résultats obtenus confirment que l'IL-33 est responsable de l'augmentation de la réponse Th2 chez les souris déficientes pour la caspase-1 car le blocage de la voie IL-33/ST2 entraîne une diminution de la réponse allergique *in vivo*. L'IL-33 joue donc un rôle important dans l'initiation de l'inflammation en réponse à la sensibilisation à l'allergène HDM. L'administration de cette protéine de fusion lors des challenges pourrait prouver que l'IL-33 régule l'éosinophilie chez les souris caspase-1^{-/-}.

La caspase-1 joue un rôle crucial dans le clivage et l'activation de l'IL-1 β . Nous démontrons une augmentation de la pro-forme de l'IL-1 β dans les poumons des souris déficientes pour la caspase-1 traitées avec HDM. Ainsi, il semble que l'inflammation pulmonaire ne soit pas dépendante de l'IL-1 β mature en absence de la caspase-1 *in vivo*. Il a été démontré que l'IL-1 β pouvait être clivée par des protéases autres que la caspase-1. En effet, chez l'homme plusieurs formes clivées d'IL-1 β ont été découvertes dans le fluide synovial de patients atteints d'arthrites et dans le lavage bronchoalvéolaire de patients souffrants de sarcoïdoses (Hazuda, Strickler et al. 1990). Dans ces pathologies, il s'agit des protéases des neutrophiles et des mastocytes qui sont impliquées dans la génération de la forme active de l'IL-1 β (la cathepsine G, l'élastase, la protéinase 3, le granzyme A et la chymase). La protéinase 3 en particulier clive le précurseur inactif de l'IL-1 β à un site proche de celui de la caspase-1 permettant son activation (Dinarello 2011). Une étude a démontré que la caspase-8 joue un rôle crucial dans la production de l'IL-1 β mature en réponse à une

stimulation des ligands de TLR3 et 4 (Maelfait, Vercammen et al. 2008). L'équipe qui a fait cette découverte montre également que la caspase-3 génère une forme intermédiaire d'IL-1 β entre 25 et 30 KDa. Il pourrait s'agir des clivages que nous observons.

Mécanisme hypothétique

Les résultats que nous avons obtenus sont novateurs. Un mécanisme expliquant l'augmentation de la production d'IL-33 et des caractéristiques de l'asthme chez des souris déficientes pour la caspase-1 dans un modèle d'inflammation pulmonaire induit par HDM n'a pas été montré tout comme les rôles régulateurs de la caspase-1 et de l'inflammasome NLRP3. Nous avons émis un mécanisme hypothétique permettant d'expliquer l'ensemble des résultats obtenus dans ce projet. L'un des DAMP le plus connu est l'acide urique libéré par les cellules mourantes ou stressées. L'acide urique est un composé présent naturellement dans le sang. Lorsque son taux est élevé, des dépôts s'accumulent dans le fluide synovial sont à l'origine des inflammations des articulations appelée « goutte ». Cependant, on retrouve des cristaux d'acide urique chez les patients et les souris atteints d'asthme allergique. De plus, la libération des cristaux d'acide urique par les cellules endommagées constitue un signal de danger endogène majeur qui active l'inflammasome NLRP3 (Martinon, Petrilli et al. 2006; Gasse, Riteau et al. 2009). Cette libération dans les poumons et le lavage bronchoalvéolaire des souris peut être induite par HDM en absence d'adjuvant (Kool, Willart et al. 2011). Il a été démontré que les cristaux d'acides uriques induisent l'activation de Syk (Spleen tyrosine kinase) (Ng, Sharma et al. 2008). D'autres études ont identifié Syk et la protéine PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) comme des intermédiaires essentiels à l'activation des neutrophiles induits par l'acide urique chez l'homme (Desaulniers, Fernandes et al. 2001; Popa-Nita, Rollet-Labelle et al. 2007). Enfin, il a été démontré dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine que les cristaux d'acide urique peuvent engendrer une réponse Th2 de façon Syk et PI3K dépendante (Kool, Willart et al. 2011). En se basant sur ces données de la littérature, nous avons émis une hypothèse de mécanisme pouvant expliquer l'augmentation des caractéristiques de l'asthme et de la production d'IL-33 indépendamment de la voie connue NLRP3/ASC/Caspase-1 en réponse à HDM (**Figure 47**).

La première voie décrite est déjà connue, à savoir la prise en charge de l'allergène d'acarien HDM reconnu par les PRR exprimés par les cellules dendritiques. Ces cellules activées dégradent l'allergène en petit peptide et migrent vers les ganglions lymphatiques. Elles présentent les peptides aux lymphocytes T naïfs via la reconnaissance CMH de classe II/TCR. Les lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes Th2 et produisent des

cytokines telles que IL-4, IL-5, IL-13 favorisant respectivement la production d'IgE, l'infiltration des éosinophiles, le remodelage bronchique.

La seconde voie est une voie hypothétique que nous démontrons. Les protéases contenues dans HDM dégradent les jonctions serrées des cellules épithéliales. L'allergène est pris en charge par les DC après avoir franchi la barrière épithéliale ce qui nous conduit à la première voie. Cependant, le fait de dégrader les jonctions serrées des cellules épithéliales conduit à un stress cellulaire et à une libération d'IL-33 et de GM-CSF. Il a été démontré que l'IL-33 stimule la production de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) par les cellules de l'immunité innée (ILC2) (Chang, DeKruyff et al. 2013). De plus, nous avons mesuré des taux d'acide urique élevés chez les souris sauvages traitées avec HDM qui sont encore plus important chez les souris caspase-1^{-/-} traitées avec le même allergène. Nous démontrons que l'instillation d'IL-33 sans HDM à des souris sauvages induit également la production d'acide urique qui active à son tour la protéine Syk. De manière très intéressante, nous montrons que la production de la protéine Syk est significativement augmentée dans les poumons des souris caspase-1^{-/-} traitées avec HDM par rapport aux souris sauvages. Dans notre mécanisme, la caspase-1 n'étant pas présente pour inactiver l'IL-33, on peut donc déduire que l'action combinée de HDM et de l'IL-33 active justifie ces taux très élevés de Syk. Par rapport aux données de la littérature, on suppose que la voie de signalisation se poursuit avec le recrutement des protéines PI3K/Akt/IKK qui activent le facteur de transcription NF-κB (Chen, Monti et al. 2013), un composant clé dans la production de plusieurs cytokines dont GM-CSF. En effet, après activation par les cellules T, l'expression du gène de GM-CSF est contrôlé par liaison du facteur de transcription NF-κB avec un site de haute affinité sur le promoteur de GM-CSF (Schreck and Baeuerle 1990). Nous montrons dans notre étude que le GM-CSF est produit en grande quantité en absence de la caspase-1 en réponse à HDM. Il s'agit d'un important facteur de croissance et un modulateur de l'immunité qui stimule les cellules souches pour produire des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles et monocytes). Les monocytes quittent la circulation sanguine et migrent vers les tissus où ils se transforment après maturation en macrophages. Nous avons démontré que les macrophages étaient une source cellulaire principale d'IL-33 dans notre modèle. L'IL-33 libérée amplifie cette voie de signalisation en induisant la production d'acide urique. En effet, il a été montré que l'IL-33 est impliqué dans l'activation des macrophages alternatifs (AAM) contribuant à la réponse asthmatique allergique (Zaiss, Kurowska-Stolarska et al. 2011).

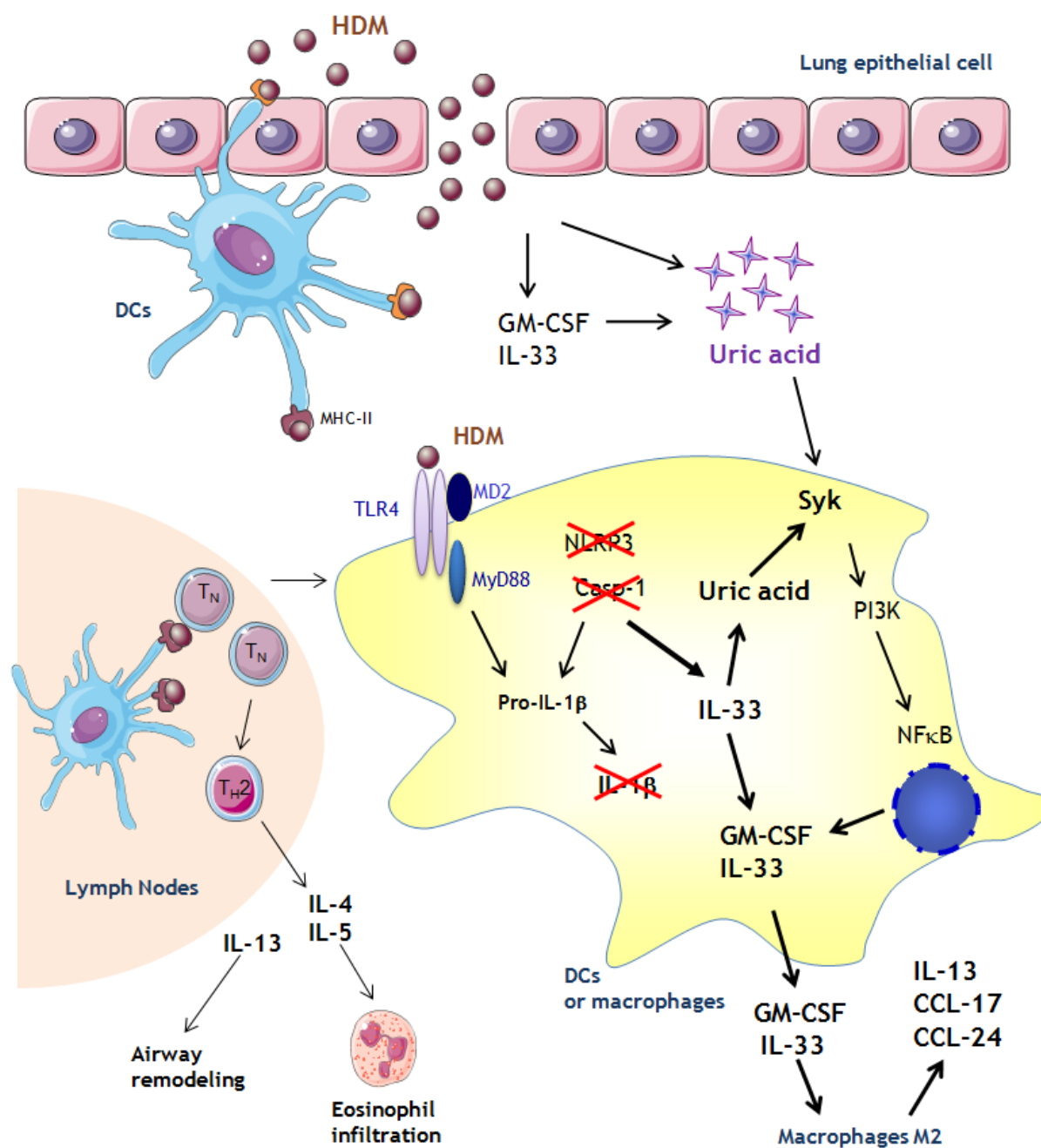


Figure 47: Hypothèse de voie de signalisation alternative en absence de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1 induisant la production d'IL-33 et un phénotype Th2 en réponse à HDM.

Il a été montré que le TLR4 activé par HDM induit la libération d'IL-1 α qui agit de manière autocrine pour permettre la libération de GM-CSF et d'IL-33 (Willart, Deswarte et al. 2012). Nous montrons dans notre étude que la production d'IL-1 α est augmentée dans les poumons des souris déficientes pour la caspase-1 traitées avec HDM. L'IL-1 α pourrait donc jouer un rôle supplémentaire dans la production d'IL-33 dans notre modèle.

Cependant, Willart *et al* montrent dans la figure 1. J des résultats contradictoires à ceux que nous avons obtenus. En effet, ils montrent qu'il n'y a aucune différence au niveau du recrutement cellulaire dans les poumons des souris caspase-1^{-/-} traitées avec HDM par rapport aux souris sauvages traitées avec le même allergène (Willart, Deswarte et al. 2012). Nous avons réalisé les expériences plusieurs fois afin de confirmer le phénotype observé. Chaque fois, le taux d'éosinophiles et toutes les caractéristiques de l'asthme étaient doublés en absence de la caspase-1.

Quelques hypothèses expliquant ces résultats différents peuvent être envisagées :

- L'extrait d'acarien que nous utilisons provient des laboratoires ALK-Abello tandis que celui qui a été utilisé par Willart *et al* provient des laboratoires Greer. La proportion et le type de protéases contenues peuvent être différents.

- Le protocole d'asthme induit par HDM que nous suivons est différent du leur. En effet, nous sensibilisons les souris avec 25 μ g de HDM au jour 0 et au jour 7 suivi de trois provocations avec 5 μ g de HDM aux jours 14 à 16. Dans le protocole utilisé par les auteurs, les souris reçoivent 1 μ g de HDM puis 7 jours plus tard, ils réalisent des provocations avec 10 μ g de HDM durant 5 jours consécutifs.

Avant de déterminer notre protocole d'asthme aigu, plusieurs tests ont été effectués. Le choix des concentrations a été fait par rapport à la publication suivante : (Phipps, Lam et al. 2009), qui administrait l'extrait de HDM aux mêmes concentrations. Les jours de traitements ont été choisis par rapport au modèle d'asthme induit par l'ovalbumine, déjà utilisé au laboratoire (Besnard, Guillou et al. 2011).

La protéine kinase C θ est critique pour l'activation des ILC2 et la mise en place de la réponse allergique.

L'un des événements clé dans l'induction de la réponse allergique est la présentation des peptides antigéniques via le CMH de classe II des cellules dendritiques et le TCR des cellules T naïves. Il s'agit de la première voie décrite précédemment. Ce contact, en plus de la participation des molécules de co-stimulation telles que CD28, permet la formation d'une synapse immunologique. C'est au niveau de cette synapse qu'est recrutée la protéine

Kinase C thêta (PKC- θ) (Zanin-Zhorov, Dustin et al. 2011). Très bien décrite dans le processus d'activation des cellules T, PKC- θ joue un rôle crucial dans l'asthme allergique et dans l'induction de la réponse Th2 (Marshall, Soos et al. 2004).

Nous avons démontré une voie alternative à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1. Nous savons que HDM induit la production d'acide urique et le recrutement de la protéine Syk. L'un des partenaires direct de Syk est la phospholipase C qui induit la production de diacylglycerol et donc de la protéine kinase C thêta (Kawakami, Kitauro et al. 2003) (Mócsai, Ruland et al. 2010). Il a été montré que PKC- θ , induit le recrutement du complexe protéique CARMA-1, BCL-10 et MALT-1, des composants qui jouent un rôle crucial et spécifique dans l'induction du facteur de transcription NF- κ B (Thome 2004) (Figure 48).

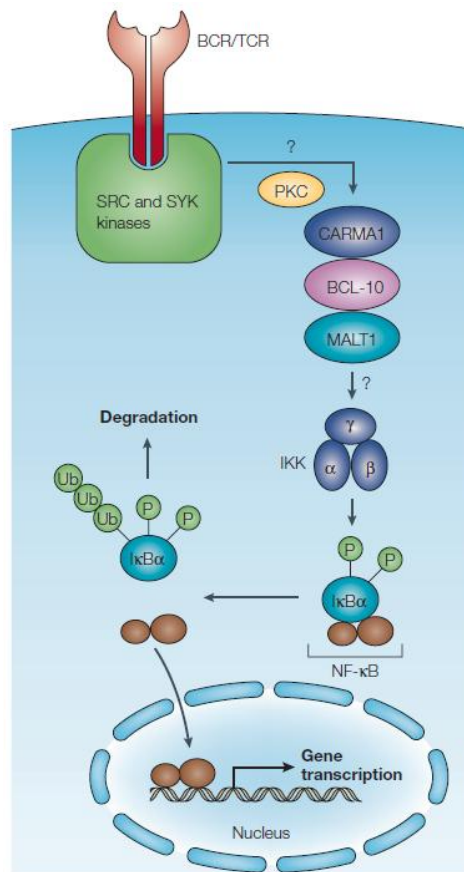


Figure 48 : Activation de NF- κ B via la voie de signalisation CARMA-1, BCL-10, MALT-1 (Thome 2004).

Mes travaux de thèse ont mis en évidence un mécanisme totalement nouveau, à savoir que le recrutement des cellules lymphoïdes innées ILC2 dépend de PKC- θ . En effet, le recrutement de ces cellules est significativement réduit en absence de PKC- θ . Nous avons supposé d'une part que l'IL-25, l'IL-33 ou le TSLP étaient impliqués dans ce phénomène puisque ce sont les activateurs directs des ILC2, or aucun défaut de production de ces

cytokines n'a été observé en absence de PKC- θ . En revanche, d'autres cytokines comme l'IL-7 ou l'IL-9 peuvent aussi activer les ILC2 (Wilhelm, Turner et al. 2012; Licona-Limon, Kim et al. 2013; Spits, Artis et al. 2013; Turner, Morrison et al. 2013). D'autre part, la réduction du recrutement des ILC2 n'est pas seulement due à un défaut dans leur activation mais peut aussi provenir d'un défaut de prolifération. L'IL-2 produite par les cellules T joue un rôle critique dans la prolifération des ILC2 *in vivo* (Roediger, Kyle et al. 2013). Or, nous montrons un défaut de production de l'IL-2 par les cellules T des souris déficientes pour PKC- θ . De plus, les ILC2 expriment le CMH de classe II qui contribue à l'activation des cellules T CD4⁺ par les antigènes (**Figure 49**) (Oliphant, Hwang et al. 2014). Ainsi la reconnaissance entre le CMH de classe II des ILC2 et le TCR des cellules T constitue une synapse immunologique qui pourrait recruter PKC- θ . Ceci permet d'établir un lien direct entre les ILC2 et PKC- θ . Nous démontrons que les fonctions des DC sont dépendantes de PKC- θ . En effet, l'expression du CMH de classe II des DC est réduite en absence de PKC- θ . Ceci peut être lié à la diminution de l'expression de IRF4 puisque ce facteur de transcription stimule les DC pour la différenciation des cellules Th2 (Williams, Tjota et al. 2013). Si l'expression du CMH de classe II des DC est réduite en absence de PKC- θ , il peut en être de même avec celui des ILC2.

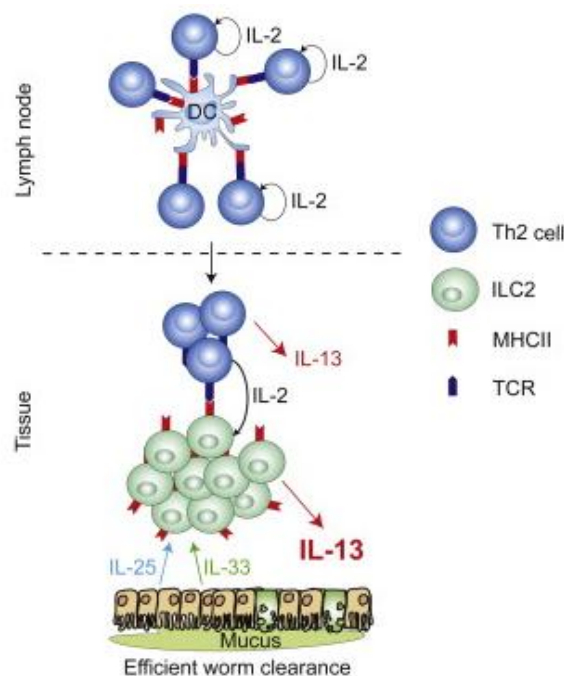


Figure 49: Reconnaissance du CMHII des ILC2 et du TCR des cellules T (Oliphant, Hwang et al. 2014).

En revanche, si PKC- θ se trouve en aval de la signalisation par rapport aux ILC2 qui sont les premières cellules à répondre aux allergènes (Halim, Steer et al. 2014), d'autres hypothèses peuvent expliquer ce défaut d'activation ou de prolifération des ILC2 dans les poumons des animaux PKC- $\theta^{-/-}$ traités avec HDM (Figure 50). D'une part, nous avons démontré que PKC- θ régule l'activation d'IRF4, un facteur de transcription qui interagit avec d'autres membres de la même famille comme PU.1 ou NFAT-1 et induit l'activation des cellules T. Ces facteurs de transcription sont connus dans la différenciation des cellules Th2 et dans l'expression des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 (Rengarajan, Mowen et al. 2002; Tamura, Taylor et al. 2005; Ahyi, Chang et al. 2009). L'IL-4 et l'IL-13 permettent le recrutement des IgE qui se fixent aux récepteurs Fc ϵ RI des mastocytes reconnus par les allergènes et cela entraîne la libération de leur granule. Parmi les molécules contenues dans les granules libérés se trouve la Prostaglandine D2. L'activation du récepteur de la Prostaglandine D2 (CRTH2) augmente l'inflammation allergique chez la souris (Spik, Brénuchon et al. 2005) et que la Prostaglandine D2 active les ILC2 via ce récepteur (Xue, Salimi et al. 2014). Nous avons constaté que les taux d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 étaient réduits dans les poumons des souris déficientes pour PKC- θ traitées avec HDM par rapport aux souris sauvages. Ces cytokines étant également produites par les ILC2, nous pouvons supposer qu'il y a moins d'IgE produits en absence de PKC- θ . Ceci entraînerait une réduction de la dégranulation des mastocytes et donc de la libération de Prostaglandine D2 et finalement une réduction du nombre d'ILC2 activées. La deuxième hypothèse s'appuie sur le fait que PKC- θ est un régulateur de la réponse Th2. En son absence, il y a moins d'IL-2 produite (Marsland, Soos et al. 2004). Or, l'IL-2 est une des cytokines qui induit la prolifération des ILC2 (Chaput, Sander et al. 2013). Ainsi en absence de PKC- θ , il y a une diminution de la production d'IL-2 et par conséquent une prolifération d'ILC2 réduite.

Mes travaux de thèse ont également montrés une réduction de l'éosinophilie dans les lavages broncho-alvéolaire des souris déficientes pour PKC- θ traitées avec HDM par rapport aux souris sauvages. Les ILC2 contrôle l'homéostasie des éosinophiles (Nussbaum, Van Dyken et al. 2013). En effet, les ILC2 dans les tissus périphériques sont une source prédominante d'IL-5 circulante. Cette cytokine déclenche et permet la différenciation et l'activation des éosinophiles. Lorsque les ILC2 sont stimulées par les cytokines des cellules épithéliales ou les cytokines Th2, la co-expression d'IL-5 et d'IL-13 est augmentée tout comme le taux d'éosinophiles local. En effet, les éosinophiles requièrent des signaux de survie délivrés par l'IL-5, l'IL-3 et le GM-CSF et les ILC2 pulmonaires peuvent contrôler le recrutement des éosinophiles à travers l'expression d'IL-5. Le défaut d'activation ou de

The diagram illustrates the molecular mechanisms of allergic airway disease, showing the interaction between various immune cells and the signaling pathways within a T lymphocyte.

Key Components and Interactions:

- Lung epithelial cells:** Release HDM (House Dust Mites) and cytokines (IL-25, IL-33, TSLP).
- DCs (Dendritic Cells):** Present MHC-II molecules.
- T lymphocyte:** Central cell with a complex signaling pathway.
 - Upstream signaling:** IL-25, IL-33, and TSLP bind to receptors, activating Syk.
 - Downstream signaling:** Syk activates PLC, which leads to DAG and PKC-θ. PKC-θ activates CARMA-1, BCL-10, and MALT-1, leading to IKK activation. IKK then activates NFκB.
 - Other pathways:** Syk also activates PI3K, which leads to NFκB. NFκB also activates IRF4 and NFAT-1.
 - Cytokine production:** The signaling pathways lead to the production of Uric acid, IL-4, IL-5, IL-13, and IL-2.
- Effector Cells and Outcomes:**
 - IL-4 and IL-13:** Lead to Airway remodeling and Eosinophil infiltration.
 - IL-2, IL-4, and IL-13:** Lead to B lymphocyte activation and IgE production.
 - IL-2 and PGD2:** Lead to Mast Cell activation.
- Lymph Nodes:** Interact with T lymphocytes, leading to the production of IL-4, IL-5, and IL-13.

De plus, en absence de PKC- θ , les lymphocytes T CD4⁺ ne prolifèrent pas et ne produisent donc pas l'IL-2 lorsqu'elles sont mises en contact avec des DC de souris sauvages incubées avec HDM. Ainsi, nos résultats confirment que les cellules T déficientes pour PKC- θ ne peuvent pas répondre à la stimulation du TCR et ne peuvent donc pas se différencier en cellules Th2.

209

que l'augmentation du recrutement des Treg contribuerait à la réduction de l'inflammation pulmonaire (Akdis, Blaser et al. 2005). Or, nous avons découvert que dans les poumons des souris déficientes pour PKC- θ , le recrutement des cellules FoxP3⁺TCR β ⁺ était également réduit, excluant ainsi un effet protecteur des lymphocytes Treg dans notre modèle.

Des études précédentes avaient démontrées le rôle régulateur de PKC- θ dans l'asthme allergique induit par l'ovalbumine (Zanin-Zhorov, Dustin et al. 2011). Nos travaux confirment les résultats dans deux autres modèles d'asthme allergique. En effet nous montrons que les caractéristiques de l'asthme (recrutement d'éosinophiles, production de mucus, hyperréactivité bronchique) sont significativement réduites en absence de PKC- θ dans l'inflammation pulmonaire induite par HDM ou par l'antigène Bet v1 du pollen de bouleau (BP) (Tourdot, Airouche et al. 2013). De plus, pour la première fois nous avons administré aux souris un inhibiteur spécifique de PKC- θ , le Compound 20 (C20) (Cywin, Dahmann et al. 2007) par voie orale lors des provocations avec les allergènes. Le C20 avait été utilisé dans des expériences *in vitro* mais son effet *in vivo* n'avait encore jamais été démontré (Zanin-Zhorov, Ding et al. 2010). Nous avons testé plusieurs doses d'inhibiteur (1mg/kg ; 10mg/ml et 30mg/ml) et il s'est avéré que la dose optimale ayant le même effet qu'en absence de PKC- θ chez les souris était la dose à 1mg/ml soit 10mg/kg. Tout comme pour les souris déficientes pour PKC- θ , nous avons observé une réduction des caractéristiques de l'asthme, ainsi que la production d'IRF4 et de NFAT-1 en réponse à HDM ou à Bet v1. PKC- θ serait une cible thérapeutique potentielle (Zanin-Zhorov, Dustin et al. 2011) dans le traitement de l'inflammation pulmonaire induite par HDM ou Bet v1.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'asthme est un véritable problème de santé publique puisque la prévalence et les coûts de cette pathologie ne cessent d'augmenter. La recherche en immunologie permet d'élucider au niveau cellulaire et moléculaire les voies de signalisation engagées dans la maladie et à pour objectif l'identification de cibles thérapeutiques potentielles. Cependant, l'aspect multifactoriel de l'asthme complique le développement de nouvelles thérapies. Jusqu'à présent, les traitements proposés aux patients servent à réduire les symptômes et à limiter leur propagation mais en aucun cas ne soignent totalement la maladie.

Il est intéressant de voir que les phénotypes allergiques sont différents d'un modèle à l'autre. Au laboratoire nous avons développé plusieurs modèles d'inflammation pulmonaire induit par différentes protéines: ovalbumine, allergène d'acarien HDM, pollen de bouleau, papain. Par exemple, les phénotypes observés concernant l'inflammasome NLRP3 sont opposés entre une induction de l'allergie par l'ovalbumine ou par HDM. A l'heure actuelle, les mécanismes de sécrétion et d'activation de l'IL-33 sont à l'origine de débat et de controverses comme ce fut le cas pour sa relation avec la caspase-1. Les travaux présentés dans cette thèse démontrent une voie de signalisation alternative à celle de l'inflammasome ainsi que l'importance de l'axe impliquant la production d'acide urique induite par HDM et le recrutement de la protéine Syk dans l'activation de l'IL-33. De plus, l'une des grandes questions à approfondir est l'identification des protéases impliquées dans le clivage de l'IL-33 dans ce modèle, les produits de ces clivages (actifs ou non) et leurs rôles (pro- ou anti-inflammatoire). Il serait également intéressant de déterminer précisément la source cellulaire de l'IL-33 chez les souris caspase-1 par des expériences d'immunofluorescence par exemple. Nous avons démontré qu'en plus des cellules épithéliales, les macrophages étaient impliqués dans la production d'IL-33 mais nous ignorons quelle population de macrophages est la plus importante au niveau pulmonaire. De plus, il serait intéressant de déterminer si les résultats obtenus seraient reproduits dans un autre modèle d'asthme induit par d'autres protéases comme la papaine puisque les phénotypes sont opposés concernant NLRP3.

D'autre part, nous avons découvert que PKC- θ jouait un rôle dans l'activation des ILC2 en réponse à l'allergène HDM. Cette découverte pourrait avoir un impact dans le domaine de l'asthme. En effet, les ILC2 jouent un rôle important dans l'asthme chez l'homme et l'amélioration de la compréhension de la façon dont ces cellules sont recrutées et activées pourrait à terme déboucher sur de nouvelles approches thérapeutiques. Nous avons émis quelques hypothèses dans la discussion de ces travaux de thèse pouvant expliquer ce phénomène encore jamais démontré. Ceci fait partie des questions restées en suspens et qui nécessitent des expériences complémentaires pour être élucidées. Il serait intéressant de voir si l'activation ou la prolifération des ILC2 est également compromise lorsque les

souris sauvages traitées avec HDM reçoivent l'inhibiteur spécifique de PKC- θ . De même, nous pouvons nous demander si des résultats similaires seraient obtenus dans le modèle d'inflammation pulmonaire induite par le pollen de bouleau.

Nous montrons une diminution des caractéristiques de l'asthme lorsque nous inhibons l'IL-33 ou PKC- θ . La protéine de fusion muST2-Fc bloque l'IL-33 et le C20, inhibe spécifiquement la PKC- θ . Ainsi, à travers nos travaux de recherche sur le petit animal nous avons approfondi les connaissances de deux cibles thérapeutiques à savoir l'IL-33 et la protéine kinase C θ .

Mais serait-il possible de transposer ces résultats à l'homme ? Les études chez l'animal ont apporté de nombreuses avancées scientifiques dans la compréhension de la pathophysiologie de l'asthme. Cependant des articles ont révélé que certains modèles murins n'imitent pas précisément les mécanismes moléculaires de la réponse inflammatoire chez l'homme. Certaines molécules présentent de très bons résultats dans les modèles animaux précliniques d'asthme allergique alors qu'elles ne sont pas efficaces sur l'homme et la réciproque est vraie (Holmes, Solari et al. 2011). De plus, d'un modèle à l'autre les protocoles d'induction de l'asthme chez la souris sont différents, les allergènes le sont également et la concentration à laquelle ils sont administrés ainsi que la durée d'administration varie d'un article à l'autre. L'asthme est une maladie qui touche uniquement l'homme. La souris, utilisée comme modèle expérimental, ne développe pas d'asthme naturellement similaire à la maladie humaine. En effet, ces animaux ont un arbre bronchique qui présente moins de ramification que celui de l'homme. Elles n'ont pas de réflexe de toux et sont incapables de respirer par la bouche. Néanmoins, de nombreux aspects de la pathologie ont été compris en étudiant les réactions immunitaires chez la souris comme le rôle des cytokines Th2 dans l'inflammation des voies respiratoires. Les modèles d'asthme chroniques chez la souris et les réactions immunitaires en réponse à des composés thérapeutiques suggèrent une certaine utilité dans la prédiction de l'efficacité clinique de ces substances chez l'homme.

Ainsi, nous pouvons nous demander s'il existe un bon modèle d'asthme? Bien sur, le meilleur modèle d'asthme que l'on puisse utiliser est le patient atteint par la pathologie. Des difficultés techniques et éthiques évidentes limitent les recherches pouvant apporter des informations sur les relations entre les types cellulaires impliqués dans l'inflammation pulmonaire et leur rôle dans le développement de la pathologie. Des études menées sur la souris sont transposable à l'homme comme des dosages cytokiniques sur des lavages broncho-alvéolaires, du sérum ou des biopsies de poumons. La publication de notre équipe

sur le rôle de l'IL-22 dans l'asthme allergique a démontré que l'expression d'ARNm de cette cytokine était augmentée dans le sérum des patients asthmatiques (Besnard, Sabat et al. 2011). L'utilisation de lignées de cellules bronchiques humaines peut également nous fournir des informations comme ce fut le cas des stimulations avec HDM que nous avons réalisées sur les BEAS-2B et les THP1. En effet, ces cellules produisent de l'IL-33 en réponse à HDM.

Nous nous sommes concentrés sur le modèle d'inflammation pulmonaire induit par l'allergène d'acarien HDM puisque plus de 80% des patients asthmatiques sont positifs à cet allergène. De plus, ces dernières années, la connaissance des allergènes d'acariens s'est étendue et nombres d'entre eux ont été isolés et parfaitement caractérisés mettant ainsi à disposition des scientifiques des outils diagnostiques et thérapeutiques performants. Parmi les allergènes respiratoires, seuls les acariens de la poussière de maison ont été clairement impliqués comme facteur déclenchant ou aggravant de l'eczéma atopique en plus d'être responsable de l'asthme allergique.

L'asthme est une maladie multifactorielle et chaque patient est unique. L'une des limites de tous les modèles d'asthme est le manque de connaissance vis à vis de la pathophysiologie de la maladie chez l'homme. Pour le moment, le seul traitement qui peut influencer et modifier le cours clinique de l'asthme allergique aux acariens est l'immunothérapie, appelée également désensibilisation ou vaccination allergénique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahyi, A.-N. N., H.-C. Chang, et al. (2009). "IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines." The Journal of Immunology **183**(3): 1598-1606.
- Ahyi, A. N., H. C. Chang, et al. (2009). "IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines." J Immunol **183**(3): 1598-1606.
- Akbari, O., P. Stock, et al. (2003). "Role of regulatory T cells in allergy and asthma." Current opinion in immunology **15**(6): 627-633.
- Akbari, O., P. Stock, et al. (2003). "Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity." Nature medicine **9**(5): 582-588.
- Akdis, M., K. Blaser, et al. (2005). "T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases." Journal of Allergy and Clinical Immunology **116**(5): 961-968.
- Akira, S., M. Yamamoto, et al. (2003). "Role of adapters in Toll-like receptor signalling." Biochemical Society Transactions **31**: 637-642.
- Ali, S., M. Huber, et al. (2007). "IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(47): 18660-18665.
- Amu, S., S. P. Saunders, et al. (2010). "Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model." Journal of Allergy and Clinical Immunology **125**(5): 1114-1124. e1118.
- Barlow, J. L., A. Bellosi, et al. (2012). "Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity." Journal of Allergy and Clinical Immunology **129**(1): 191-198.e194.
- Bartemes, K. R. and H. Kita (2012). "Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma." Clinical Immunology **143**(3): 222-235.
- Beck, J. M., V. B. Young, et al. (2012). "The microbiome of the lung." Translational Research **160**(4): 258-266.
- Besnard, A.-G., R. Sabat, et al. (2011). "Dual Role of IL-22 in Allergic Airway Inflammation and its Cross-talk with IL-17A." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **183**(9): 1153-1163.
- Besnard, A., D. Togbe, et al. (2011). "IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation." European Journal of Immunology **41**(6): 1675-1686.
- Besnard, A. G., N. Guillou, et al. (2011). "NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant." Allergy **66**(8): 1047-1057.
- Besnard, A. G., N. Guillou, et al. (2011). "NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant." Allergy **66**(8): 1047-1057.
- Besnard, A. G., R. Sabat, et al. (2011). "Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A." Am J Respir Crit Care Med **183**(9): 1153-1163.
- Birrell, M. A. and S. Eltom (2011). "The role of the NLRP3 Inflammasome in the pathogenesis of airway disease." Pharmacology & Therapeutics **130**(3): 364-370.
- Blanchard, C. and M. E. Rothenberg (2009). "Biology of the eosinophil." Advances in immunology **101**: 81-121.
- Blasius, A. L. and B. Beutler (2010). "Intracellular Toll-like Receptors." Immunity **32**(3): 305-315.
- Bordas-Le Floch, V., L. Bussi res, et al. (2012). "Expression and Characterization of Natural-Like Recombinant Der p 2 for Sublingual Immunotherapy." International Archives of Allergy and Immunology **158**(2): 157-167.
- Brewer, J. M., M. Conacher, et al. (1999). "Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4-or IL-13-mediated signaling." The Journal of Immunology **163**(12): 6448-6454.
- Broz, P., K. Newton, et al. (2010). "Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella." J Exp Med **207**(8): 1745-1755.

- Bulek, K., S. Swaidani, et al. (2009). "The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response." The Journal of Immunology **182**(5): 2601-2609.
- Cady, C. T., M. S. Powell, et al. (2010). "IgG antibodies produced during subcutaneous allergen immunotherapy mediate inhibition of basophil activation via a mechanism involving both FcγRIIA and FcγRIIB." Immunology Letters **130**(1-2): 57-65.
- Carriere, V., L. Roussel, et al. (2007). "IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 282-287.
- Carta, S., R. Lavieri, et al. (2013). "Different members of the IL-1 family come out in different ways: DAMPs vs. cytokines?" Frontiers in immunology **4**.
- Cayrol, C. and J.-P. Girard (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(22): 9021-9026.
- Cayrol, C. and J. P. Girard (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(22): 9021-9026.
- Chambers, L., A. Brown, et al. (1998). "Enzymatically active papain preferentially induces an allergic response in mice." Biochem Biophys Res Commun **253**(3): 837-840.
- Chambers, L., A. Brown, et al. (1998). "Enzymatically Active Papain Preferentially Induces an Allergic Response in Mice." Biochemical and Biophysical Research Communications **253**(3): 837-840.
- Chang, Y.-J., R. H. DeKruyff, et al. (2013). "The role of type 2 innate lymphoid cells in asthma." Journal of leukocyte biology **94**(5): 933-940.
- Chapman, M. D., S. Wunschmann, et al. (2007). "Proteases as Th2 adjuvants." Curr Allergy Asthma Rep **7**(5): 363-367.
- Chaput, C., L. E. Sander, et al. (2013). "NOD-like receptors in lung diseases." Frontiers in immunology **4**.
- Chen, C.-J., H. Kono, et al. (2007). "Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells." Nat Med **13**(7): 851-856.
- Chen, C. J., H. Kono, et al. (2007). "Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells." Nat Med **13**(7): 851-856.
- Chen, L., S. Monti, et al. (2013). "SYK inhibition modulates distinct PI3K/AKT-dependent survival pathways and cholesterol biosynthesis in diffuse large B cell lymphomas." Cancer cell **23**(6): 826-838.
- Chen, M., H. Wang, et al. (2011). "Regulation of adaptive immunity by the NLRP3 inflammasome." International Immunopharmacology **11**(5): 549-554.
- Clarke, D. L., N. H. E. Davis, et al. (2014). "Dectin-2 sensing of house dust mite is critical for the initiation of airway inflammation." Mucosal Immunol **7**(3): 558-567.
- Coraux, C., R. Hajj, et al. (2005). "Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire." M/S: médecine sciences **21**(12): 1063-1069.
- Cosmi, L., V. Santarlasci, et al. (2014). "Th17 plasticity: pathophysiology and treatment of chronic inflammatory disorders." Current Opinion in Pharmacology **17**(0): 12-16.
- Coyle, A. J., C. Lloyd, et al. (1999). "Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses." J Exp Med **190**(7): 895-902.
- Cywin, C. L., G. Dahmann, et al. (2007). "Discovery of potent and selective PKC-θ inhibitors." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **17**(1): 225-230.
- Dai, X., K. Sayama, et al. (2011). "Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes." Journal of Allergy and Clinical Immunology **127**(3): 806-814.e804.
- Deckers, J., F. Branco Madeira, et al. (2013). "Innate immune cells in asthma." Trends in Immunology **34**(11): 540-547.
- Delmas, M. C. and C. Fuhrman (2010). "L'asthme en France : synthèse des données épidémiologiques descriptives." Revue des Maladies Respiratoires **27**(2): 151-159.

- Desaulniers, P., M. Fernandes, et al. (2001). "Crystal-induced neutrophil activation. VII. Involvement of Syk in the responses to monosodium urate crystals." Journal of leukocyte biology **70**(4): 659-668.
- Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." Annual review of immunology **27**: 519-550.
- Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases.
- Eisenbarth, S. C., O. R. Colegio, et al. (2008). "Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants." Nature **453**(7198): 1122-1126.
- Endo, Y., K. Hirahara, et al. (2014). "Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation." Trends in Immunology **35**(2): 69-78.
- Fang, X., R. Wang, et al. (2012). "Ameliorated ConA-induced hepatitis in the absence of PKC-theta." PLoS One **7**(2): e31174.
- Fattouh, R., A. Al-Garawi, et al. (2011). "Eosinophils Are Dispensable for Allergic Remodeling and Immunity in a Model of House Dust Mite-induced Airway Disease." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **183**(2): 179-188.
- Felton, J. M., C. D. Lucas, et al. (2014). "Eosinophils in the lung-modulating apoptosis and efferocytosis in airway inflammation." Frontiers in immunology **5**.
- Finkelman, F. D. and J. F. Urban, Jr. (2001). "The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines." J Allergy Clin Immunol **107**(5): 772-780.
- Firestein, G. S., R. Budd, et al. (2012). Kelley's Textbook of Rheumatology: Expert Consult Premium Edition: Enhanced Online Features, Elsevier Health Sciences.
- Fort, M. M., J. Cheung, et al. (2001). "IL-25 Induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-Associated Pathologies In Vivo." Immunity **15**(6): 985-995.
- Franchi, L., N. Kamada, et al. (2012). "NLR4-driven production of IL-1beta discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense." Nat Immunol **13**(5): 449-456.
- Fulkerson, P. C. and M. E. Rothenberg (2013). "Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond." Nat Rev Drug Discov **12**(2): 117-129.
- Galli, S. J., N. Borregaard, et al. (2011). "Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils." Nat Immunol **12**(11): 1035-1044.
- Galli, S. J., M. Tsai, et al. (2008). "The development of allergic inflammation." Nature **454**(7203): 445-454.
- Gao, Y., Simone A. Nish, et al. (2013). "Control of T Helper 2 Responses by Transcription Factor IRF4-Dependent Dendritic Cells." Immunity **39**(4): 722-732.
- Garlanda, C., Charles A. Dinarello, et al. (2013). "The Interleukin-1 Family: Back to the Future." Immunity **39**(6): 1003-1018.
- Gasse, P., N. Riteau, et al. (2009). "Uric Acid Is a Danger Signal Activating NALP3 Inflammasome in Lung Injury Inflammation and Fibrosis." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **179**(10): 903-913.
- Gill, M. A. (2012). "The role of dendritic cells in asthma." Journal of Allergy and Clinical Immunology **129**(4): 889-901.
- Gollwitzer, E. S. and B. J. Marsland (2014). "Microbiota abnormalities in inflammatory airway diseases – Potential for therapy." Pharmacology & Therapeutics **141**(1): 32-39.
- Gough, L., O. Schulz, et al. (1999). "The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response." J Exp Med **190**(12): 1897-1902.
- Gough, L., O. Schulz, et al. (1999). "The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response." The Journal of Experimental Medicine **190**(12): 1897-1902.

- Gregory, L. G. and C. M. Lloyd (2011). "Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung." Trends Immunol **32**(9): 402-411.
- Gregory, L. G. and C. M. Lloyd (2011). "Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung." Trends in Immunology **32**(9): 402-411.
- Gudbjartsson, D. F., U. S. Bjornsdottir, et al. (2009). "Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction." Nat Genet **41**(3): 342-347.
- Gudbjartsson, D. F., U. S. Bjornsdottir, et al. (2009). "Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction." Nat Genet **41**(3): 342-347.
- Gueders, M., G. Paulissen, et al. (2009). "Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production." Inflammation Research **58**(12): 845-854.
- Guilliams, M., P. Bruhns, et al. (2014). "The function of Fc[gamma] receptors in dendritic cells and macrophages." Nat Rev Immunol **14**(2): 94-108.
- Gupta, S., S. Manicassamy, et al. (2008). "Differential requirement of PKC- θ in the development and function of natural regulatory T cells." Molecular Immunology **46**(2): 213-224.
- Hachem, P., M. Lisbonne, et al. (2005). "Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma." Eur J Immunol **35**(10): 2793-2802.
- Halim, Timotheus Y. F., Catherine A. Steer, et al. (2014). "Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Critical for the Initiation of Adaptive T Helper 2 Cell-Mediated Allergic Lung Inflammation." Immunity **40**(3): 425-435.
- Hall, S. and D. K. Agrawal (2014). "Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma." International Immunopharmacology(0).
- Hammad, H., M. Chieppa, et al. (2009). "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells." Nat Med **15**(4): 410-416.
- Hammad, H., M. Chieppa, et al. (2009). "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells." Nat Med **15**(4): 410-416.
- Hammad, H. and B. N. Lambrecht (2008). "Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma." Nat Rev Immunol **8**(3): 193-204.
- Hammad, H. and B. N. Lambrecht (2011). "Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses." Allergy **66**(5): 579-587.
- Hammad, H., M. Plantinga, et al. (2010). "Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen." J Exp Med **207**(10): 2097-2111.
- Haraldsen, G., J. Balogh, et al. (2009). "Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin?" Trends Immunol **30**(5): 227-233.
- Hayakawa, H., M. Hayakawa, et al. (2007). "Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation." Journal of Biological Chemistry **282**(36): 26369-26380.
- Hazuda, D. J., J. Strickler, et al. (1990). "Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease." Journal of Biological Chemistry **265**(11): 6318-6322.
- Herrick, C. A. and K. Bottomly (2003). "To respond or not to respond: T cells in allergic asthma." Nat Rev Immunol **3**(5): 405-412.
- Holgate, S. T. (2007). "Epithelium dysfunction in asthma." Journal of Allergy and Clinical Immunology **120**(6): 1233-1244.
- Holgate, S. T. (2008). "Pathogenesis of asthma." Clinical & Experimental Allergy **38**(6): 872-897.
- Holgate, S. T. (2012). "Innate and adaptive immune responses in asthma." Nat Med **18**(5): 673-683.

- Holmes, A. M., R. Solari, et al. (2011). "Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches." Drug Discovery Today **16**(15-16): 659-670.
- Iwamura, C. and T. Nakayama (2010). "Role of NKT cells in allergic asthma." Current opinion in immunology **22**(6): 807-813.
- Jacquet, A. (2011). "The role of innate immunity activation in house dust mite allergy." Trends in Molecular Medicine **17**(10): 604-611.
- Jacquet, A. (2013). "Innate immune responses in house dust mite allergy." ISRN Allergy **2013**: 735031.
- Jacquet, A. (2013). "Innate immune responses in house dust mite allergy." International Scholarly Research Notices **2013**.
- Jakubzick, C., M. Bogunovic, et al. (2008). "Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes." The Journal of experimental medicine **205**(12): 2839-2850.
- Jartti, T. and J. E. Gern (2011). "Rhinovirus-associated wheeze during infancy and asthma development." Current respiratory medicine reviews **7**(3): 160.
- John, G., K. Kohse, et al. (2014). "The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models." Clinical Science **126**(3): 207-221.
- Kato, Z., J. Jee, et al. (2003). "The structure and binding mode of interleukin-18." Nat Struct Mol Biol **10**(11): 966-971.
- Kawakami, Y., J. Kitaura, et al. (2003). "A Ras activation pathway dependent on Syk phosphorylation of protein kinase C." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(16): 9470-9475.
- Kawayama, T., M. Okamoto, et al. (2012). "Interleukin-18 in pulmonary inflammatory diseases." Journal of Interferon & Cytokine Research **32**(10): 443-449.
- Kayagaki, N., S. Warming, et al. (2011). "Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11." Nature **479**(7371): 117-121.
- Kayagaki, N., S. Warming, et al. (2011). "Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11." Nature **479**(7371): 117-121.
- Kearley, J., K. F. Buckland, et al. (2009). "Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway." Am J Respir Crit Care Med **179**(9): 772-781.
- Kheradmand, F., A. Kiss, et al. (2002). "A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease." J Immunol **169**(10): 5904-5911.
- Kim, H. Y., R. H. DeKruyff, et al. (2010). "The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity." Nature immunology **11**(7): 577-584.
- Kips, J. C., B. J. O'Connor, et al. (2003). "Effect of SCH55700, a Humanized Anti-Human Interleukin-5 Antibody, in Severe Persistent Asthma." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **167**(12): 1655-1659.
- Kobayashi, Y., C. Bossley, et al. (2014). "Passive Smoking Impairs Histone Deacetylase-2 in Children With Severe Asthma." Chest **145**(2): 305-312.
- Kool, M., Monique A. M. Willart, et al. (2011). "An Unexpected Role for Uric Acid as an Inducer of T Helper 2 Cell Immunity to Inhaled Antigens and Inflammatory Mediator of Allergic Asthma." Immunity **34**(4): 527-540.
- Kouzaki, H., K. Iijima, et al. (2011). "The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses." The Journal of Immunology **186**(7): 4375-4387.
- Kuida, K., J. A. Lippke, et al. (1995). "Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme." Science **267**(5206): 2000-2003.
- Kuida, K., J. A. Lippke, et al. (1995). "Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme." Science **267**(5206): 2000-2003.

- Kuroda, E., K. J. Ishii, et al. (2011). "Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms." Immunity **34**(4): 514-526.
- Kurowska-Stolarska, M., B. Stolarski, et al. (2009). "IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation." J Immunol **183**(10): 6469-6477.
- Lambotin, M., S. Raghuraman, et al. (2010). "A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells." Nature Reviews Microbiology **8**(5): 350-360.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad (2012). "The airway epithelium in asthma." Nat Med **18**(5): 684-692.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad (2013). "Death at the airway epithelium in asthma." Cell Res **23**(5): 588-589.
- Leckie, M. J. (2003). "Anti-Interleukin-5 Monoclonal Antibodies." American Journal of Respiratory Medicine **2**(3): 245-259.
- Lefrancais, E. and C. Cayrol (2012). "Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members." Eur Cytokine Netw **23**(4): 120-127.
- Lefrançais, E. and C. Cayrol (2012). "Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members." European cytokine network **23**(4): 120-127.
- Lefrançais, E., S. Roga, et al. (2012). "IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(5): 1673-1678.
- Lefrancais, E., S. Roga, et al. (2012). "IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(5): 1673-1678.
- Li, B. W. and R. W. Hendriks (2013). "Group 2 innate lymphoid cells in lung inflammation." Immunology **140**(3): 281-287.
- Li, H., S. B. Willingham, et al. (2008). "Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3." The Journal of Immunology **181**(1): 17-21.
- Li, P., H. Allen, et al. (1995). "Mice deficient in IL-1 β -converting enzyme are defective in production of mature IL-1 β and resistant to endotoxic shock." Cell **80**(3): 401-411.
- Liang, S. C., X.-Y. Tan, et al. (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." The Journal of Experimental Medicine **203**(10): 2271-2279.
- Licona-Limon, P., L. K. Kim, et al. (2013). "TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells." Nat Immunol **14**(6): 536-542.
- Liew, F. Y., N. I. Pitman, et al. (2010). "Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family." Nat Rev Immunol **10**(2): 103-110.
- Lindell, D. M., A. A. Berlin, et al. (2008). "B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease." PLoS One **3**(9): e3129.
- Liu, C.-F., D. Drocourt, et al. (2013). "Innate immune response of alveolar macrophage to house dust mite allergen is mediated through TLR2/-4 co-activation." PLoS One **8**(10): e75983.
- Liu, Y.-C., X.-B. Zou, et al. (2014). "Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases." International Journal of Biological Sciences **10**(5): 520.
- Lloyd, C. M. (2009). "Dust mites' dirty dealings in the lung." Nat Med **15**(4): 366-367.
- Lloyd, C. M. (2010). "IL-33 family members and asthma-bridging innate and adaptive immune responses." Current opinion in immunology **22**(6): 800-806.
- Lötvall, J., C. A. Akdis, et al. (2011). "Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome." Journal of Allergy and Clinical Immunology **127**(2): 355-360.

- Lukacs, N. W. (2001). "Role of chemokines in the pathogenesis of asthma." Nat Rev Immunol 1(2): 108-116.
- Lukens, J. R., J. M. Gross, et al. (2012). "IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease." Front Immunol 3: 315.
- Luthi, A. U., S. P. Cullen, et al. (2009). "Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases." Immunity 31(1): 84-98.
- Maelfait, J., E. Vercammen, et al. (2008). "Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-18 maturation by caspase-8." The Journal of Experimental Medicine 205(9): 1967-1973.
- Mamessier, E., K. Botturi, et al. (2005). "Lymphocytes T régulateurs, atopie et asthme : un nouveau concept en trois dimensions." Revue des Maladies Respiratoires 22(2, Part 1): 305-311.
- Mariathasan, S., K. Newton, et al. (2004). "Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf." Nature 430(6996): 213-218.
- Marsland, B. J., T. J. Soos, et al. (2004). "Protein Kinase C θ Is Critical for the Development of In Vivo T Helper (Th)2 Cell But Not Th1 Cell Responses." The Journal of Experimental Medicine 200(2): 181-189.
- Marsland, B. J., K. Yadava, et al. (2013). "The airway microbiome and disease" Chest 144(2): 632-637.
- Martinez, F. D. and D. Vercelli (2013). "Asthma." The Lancet 382(9901): 1360-1372.
- Martinon, F., K. Burns, et al. (2002). "The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-1 β ." Molecular Cell 10(2): 417-426.
- Martinon, F., A. Mayor, et al. (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." Annual review of immunology 27: 229-265.
- Martinon, F., A. Mayor, et al. (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." Annu Rev Immunol 27: 229-265.
- Martinon, F., V. Petrilli, et al. (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature 440(7081): 237-241.
- Martinon, F., V. Petrilli, et al. (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature 440(7081): 237-241.
- Matangkasombut, P., M. Pichavant, et al. (2009). "Natural killer T cells and the regulation of asthma." Mucosal immunology 2(5): 383-392.
- Meng, J.-F. and L. J. Rosenwasser (2010). "Unraveling the Genetic Basis of Asthma and Allergic Diseases." Allergy Asthma Immunol Res 2(4): 215-227.
- Merad, M., P. Sathe, et al. (2013). "The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting." Annual review of immunology 31.
- Miller, A. M. (2011). "Role of IL-33 in inflammation and disease." J Inflamm (Lond) 8(1): 22.
- Mócsai, A., J. Ruland, et al. (2010). "The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions." Nature Reviews Immunology 10(6): 387-402.
- Moffatt, M. F., I. G. Gut, et al. (2010). "A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma." N Engl J Med 363(13): 1211-1221.
- Moreira, A. P. and C. M. Hogaboam (2011). "Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro-and anti-inflammatory actions for disease resolution." Journal of Interferon & Cytokine Research 31(6): 485-491.
- Moro, K., T. Yamada, et al. (2010). "Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺Sca-1⁺ lymphoid cells." Nature 463(7280): 540-544.
- Motomura, Y., H. Morita, et al. (2014). "Basophil-Derived Interleukin-4 Controls the Function of Natural Helper Cells, a Member of ILC2s, in Lung Inflammation." Immunity 40(5): 758-771.
- Moussion, C., N. Ortega, et al. (2008). "The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'?" PLoS One 3(10): e3331.

- Murphy, V. E., P. G. Gibson, et al. (2005). "Asthma during pregnancy: mechanisms and treatment implications." European Respiratory Journal **25**(4): 731-750.
- Neill, D. R., S. H. Wong, et al. (2010). "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." Nature **464**(7293): 1367-1370.
- Neill, D. R., S. H. Wong, et al. (2010). "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." Nature **464**(7293): 1367-1370.
- Ng, G., K. Sharma, et al. (2008). "Receptor-Independent, Direct Membrane Binding Leads to Cell-Surface Lipid Sorting and Syk Kinase Activation in Dendritic Cells." Immunity **29**(5): 807-818.
- Nile, C. J., E. Barksby, et al. (2010). "Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes." Immunology **130**(2): 172-180.
- Noh, G. and J. H. Lee (2011). "Regulatory B cells and allergic diseases." Allergy, asthma & immunology research **3**(3): 168-177.
- Nussbaum, J. C., S. J. Van Dyken, et al. (2013). "Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis." Nature **502**(7470): 245-248.
- Oboki, K., T. Ohno, et al. (2010). "IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(43): 18581-18586.
- Oh, C., G. Geba, et al. (2010). "Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma." European Respiratory Review **19**(115): 46-54.
- Ohno, T., H. Morita, et al. (2012). "Interleukin-33 in allergy." Allergy **67**(10): 1203-1214.
- Ohno, T., K. Oboki, et al. (2009). "Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages." J Immunol **183**(12): 7890-7897.
- Ohno, T., K. Oboki, et al. (2009). "Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages." The Journal of Immunology **183**(12): 7890-7897.
- Oliphant, Christopher J., You Y. Hwang, et al. (2014). "MHCII-Mediated Dialog between Group 2 Innate Lymphoid Cells and CD4⁺ T Cells Potentiates Type 2 Immunity and Promotes Parasitic Helminth Expulsion." Immunity **41**(2): 283-295.
- Onari, Y., A. Yokoyama, et al. (2009). "IL-12p40 is essential for the down-regulation of airway hyperresponsiveness in a mouse model of bronchial asthma with prolonged antigen exposure." Clinical & Experimental Allergy **39**(2): 290-298.
- Page, K. M., D. Chaudhary, et al. (2008). "Natural killer cells from protein kinase C theta^{-/-} mice stimulated with interleukin-12 are deficient in production of interferon-gamma." J Leukoc Biol **83**(5): 1267-1276.
- Palmer, G. and C. Gabay (2011). "Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases." Nat Rev Rheumatol **7**(6): 321-329.
- Palmer, G., B. P. Lipsky, et al. (2008). "The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33." Cytokine **42**(3): 358-364.
- Parsons, M. W., L. Li, et al. (2014). "Dectin-2 Regulates the Effector Phase of House Dust Mite-Elicited Pulmonary Inflammation Independently from Its Role in Sensitization." The Journal of Immunology **192**(4): 1361-1371.
- Pastorelli, L., R. R. Garg, et al. (2010). "Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(17): 8017-8022.
- Paul, W. E. and J. Zhu (2010). "How are TH2-type immune responses initiated and amplified?" Nat Rev Immunol **10**(4): 225-235.
- Pease, J. E. (2006). "Asthma, allergy and chemokines." Current drug targets **7**(1): 3-12.
- Perumal, N. B. and M. H. Kaplan (2011). "Regulating IL9 transcription in T helper cells." Trends in Immunology **32**(4): 146-150.
- Phipps, S., C. E. Lam, et al. (2009). "Toll/IL-1 Signaling Is Critical for House Dust Mite-specific Th1 and Th2 Responses." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **179**(10): 883-893.

- Popa-Nita, O., E. Rollet-Labelle, et al. (2007). "Crystal-induced neutrophil activation. IX. Syk-dependent activation of class Ia phosphatidylinositol 3-kinase." Journal of leukocyte biology **82**(3): 763-773.
- Prefontaine, D., S. Lajoie-Kadoch, et al. (2009). "Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells." J Immunol **183**(8): 5094-5103.
- Prefontaine, D., J. Nadigel, et al. (2010). "Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma." J Allergy Clin Immunol **125**(3): 752-754.
- Préfontaine, D., J. Nadigel, et al. (2010). "Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma." Journal of Allergy and Clinical Immunology **125**(3): 752-754.
- Price, A. E., H.-E. Liang, et al. (2010). "Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(25): 11489-11494.
- Rengarajan, J., K. A. Mowen, et al. (2002). "Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression." The Journal of Experimental Medicine **195**(8): 1003-1012.
- Rengarajan, J., K. A. Mowen, et al. (2002). "Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression." J Exp Med **195**(8): 1003-1012.
- Robays, L. J., T. Maes, et al. (2009). "Between a cough and a wheeze: dendritic cells at the nexus of tobacco smoke-induced allergic airway sensitization." Mucosal Immunology **2**(3): 206-219.
- Roediger, B., R. Kyle, et al. (2013). "Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells." Nat Immunol **14**(6): 564-573.
- Saenz, S. A., M. C. Siracusa, et al. (2010). "IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes TH2 cytokine responses." Nature **464**(7293): 1362-1366.
- Salek-Ardakani, S., T. So, et al. (2004). Differential regulation of Th2 and Th1 lung inflammatory responses by protein kinase C θ . J Immunol. **173**: 6440-6447.
- Scanlon, S. T. and A. N. J. McKenzie (2012). "Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy." Current opinion in immunology **24**(6): 707-712.
- Schmitt, E., M. Klein, et al. (2014). "Th9 cells, new players in adaptive immunity." Trends in Immunology **35**(2): 61-68.
- Schmitz, J., A. Owyang, et al. (2005). "IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines." Immunity **23**(5): 479-490.
- Schmitz, J., A. Owyang, et al. (2005). "IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines." Immunity **23**(5): 479-490.
- Schmitz, N., M. Kurrer, et al. (2003). "The IL-1 receptor 1 is critical for Th2 cell type airway immune responses in a mild but not in a more severe asthma model." European journal of immunology **33**(4): 991-1000.
- Schreck, R. and P. A. Baeuerle (1990). "NF-kappa B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene." Molecular and cellular biology **10**(3): 1281-1286.
- Schuijs, M. J., M. A. Willart, et al. (2013). "Cytokine targets in airway inflammation." Current Opinion in Pharmacology **13**(3): 351-361.
- Shifren (2012). "Mechanisms of Remodeling in Asthmatic Airways." Journal of Allergy **2012**.
- Shimosato, T., M. Fujimoto, et al. (2010). "CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9." Biochem Biophys Res Commun **394**(1): 81-86.
- Simpson, J. L., S. Phipps, et al. (2014). "Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma." European Respiratory Journal **43**(4): 1067-1076.
- Smith, D. (2010). "IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma." Clinical & Experimental Allergy **40**(2): 200-208.

- Smithgall, M. D., M. R. Comeau, et al. (2008). "IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells." Int Immunol **20**(8): 1019-1030.
- Sokol, C. L., G. M. Barton, et al. (2008). "A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses." Nat Immunol **9**(3): 310-318.
- Song, C., L. Luo, et al. (2008). "IL-17-Producing Alveolar Macrophages Mediate Allergic Lung Inflammation Related to Asthma." The Journal of Immunology **181**(9): 6117-6124.
- Spik, I., C. Brénuchon, et al. (2005). "Activation of the prostaglandin D2 receptor DP2/CRTH2 increases allergic inflammation in mouse." The Journal of Immunology **174**(6): 3703-3708.
- Spits, H., D. Artis, et al. (2013). "Innate lymphoid cells [mdash] a proposal for uniform nomenclature." Nat Rev Immunol **13**(2): 145-149.
- Sun, Z., C. W. Arendt, et al. (2000). "PKC- θ is required for TCR-induced NF- κ B activation in mature but not immature T lymphocytes." Nature **404**(6776): 402-407.
- Takai, T. and S. Ikeda (2011). "Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases." Allergol Int **60**(1): 25-35.
- Tamura, T., P. Taylor, et al. (2005). "IFN regulatory factor-4 and-8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity." The Journal of Immunology **174**(5): 2573-2581.
- Tassi, I., M. Cella, et al. (2008). "NK cell-activating receptors require PKC- θ for sustained signaling, transcriptional activation, and IFN- γ secretion." Blood **112**(10): 4109-4116.
- Thomas, W. R., B. J. Hales, et al. (2010). "House dust mite allergens in asthma and allergy." Trends Mol Med **16**(7): 321-328.
- Thome, M. (2004). "CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation." Nat Rev Immunol **4**(5): 348-359.
- Thome, M. (2004). "CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation." Nature Reviews Immunology **4**(5): 348-359.
- Tobón, G. J., J. H. Izquierdo, et al. (2013). "B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity—Focus on Systemic Lupus Erythematosus." Autoimmune diseases **2013**.
- Torday, J. S. and V. K. Rehan (2013). "An epigenetic'smoking gun'for reproductive inheritance." Expert Review of Obstetrics & Gynecology **8**(2): 99-101.
- Tourdot, S., S. Airouche, et al. (2013). "Efficacy of sublingual vectorized recombinant Bet v 1a in a mouse model of birch pollen allergic asthma." Vaccine **31**(23): 2628-2637.
- Townsend, M. J., P. G. Fallon, et al. (2000). "T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses." J Exp Med **191**(6): 1069-1076.
- Tulic, M. K., P.-O. Fiset, et al. (2005). "Cytokines and chemokines in asthma: an overview." Physiologic Basis of Respiratory Disease, edited by Hamid Q, Shannon J, and Martin J. Hamilton, Canada: BC Becker: 453-467.
- Turner, J.-E., P. J. Morrison, et al. (2013). "IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation." The Journal of Experimental Medicine **210**(13): 2951-2965.
- van de Veen, W., B. Stanic, et al. (2013). "IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses." Journal of Allergy and Clinical Immunology **131**(4): 1204-1212.
- van Rijt, L. S., H. Kuipers, et al. (2004). "A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma." J Immunol Methods **288**(1-2): 111-121.
- Vercelli, D. (2008). "Discovering susceptibility genes for asthma and allergy." Nat Rev Immunol **8**(3): 169-182.

- Vivier, E., S. Ugolini, et al. (2012). "Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer." Nat Rev Immunol **12**(4): 239-252.
- Walker, J. A., J. L. Barlow, et al. (2013). "Innate lymphoid cells--how did we miss them?" Nat Rev Immunol **13**(2): 75-87.
- Walsh, J. G., D. A. Muruve, et al. (2014). "Inflammasomes in the CNS." Nat Rev Neurosci **15**(2): 84-97.
- Walsh, K. P. and K. H. G. Mills (2013). "Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation." Trends in Immunology **34**(11): 521-530.
- Wambre, E., E. A. James, et al. (2012). "Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy." Current opinion in immunology **24**(6): 700-706.
- Wan, H., H. L. Winton, et al. (1999). "Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions." J Clin Invest **104**(1): 123-133.
- Wenzel, S. E. (2012). "Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches." Nat Med **18**(5): 716-725.
- Wilhelm, C., J.-E. Turner, et al. (2012). "The many lives of IL-9: a question of survival[quest]." Nat Immunol **13**(7): 637-641.
- Willart, M. A., K. Deswarte, et al. (2012). "Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33." J Exp Med **209**(8): 1505-1517.
- Willart, M. A., K. Deswarte, et al. (2012). "Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33." The Journal of experimental medicine **209**(8): 1505-1517.
- Williams, C. M., S. Rahman, et al. (2012). "Cytokine pathways in allergic disease." Toxicologic pathology **40**(2): 205-215.
- Williams, J. W., M. Y. Tjota, et al. (2013). "Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation." Nat Commun **4**.
- Williams, J. W., M. Y. Tjota, et al. (2013). "Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation." Nat Commun **4**: 2990.
- Wong, C., C. Ho, et al. (2001). "Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma." Clinical & Experimental Immunology **125**(2): 177-183.
- Wu, L. C. and A. A. Zarrin (2014). "The production and regulation of IgE by the immune system." Nature Reviews Immunology.
- Xue, L., M. Salimi, et al. (2014). "Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells." Journal of Allergy and Clinical Immunology **133**(4): 1184-1194.e1187.
- Yang, Y. and X. Huang (2011). "Targeting co-stimulatory pathways in gene therapy." Frontiers in Microbiology **2**.
- Zaiss, M. M., M. Kurowska-Stolarska, et al. (2011). "IL-33 Shifts the Balance from Osteoclast to Alternatively Activated Macrophage Differentiation and Protects from TNF- α -Mediated Bone Loss." The Journal of Immunology **186**(11): 6097-6105.
- Zanin-Zhorov, A., Y. Ding, et al. (2010). "Protein Kinase C- θ Mediates Negative Feedback on Regulatory T Cell Function." Science **328**(5976): 372-376.
- Zanin-Zhorov, A., M. L. Dustin, et al. (2011). "PKC- θ function at the immunological synapse: prospects for therapeutic targeting." Trends in Immunology **32**(8): 358-363.
- Zemp, E., T. Schikowski, et al. (2012). "Asthma and the menopause: A systematic review and meta-analysis." Maturitas **73**(3): 212-217.
- Zhao, W. and Z. Hu (2010). "The enigmatic processing and secretion of interleukin-33." Cell Mol Immunol **7**(4): 260-262.
- Zheng, Y., D. M. Danilenko, et al. (2007). "Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis." Nature **445**(7128): 648-651.
- Zhong, Y., A. Kinio, et al. (2013). "Functions of NOD-like receptors in human diseases." Frontiers in immunology **4**.

ANNEXES

Annexe 1 (Revue 1): TSLP, une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'asthme allergique

TSLP, a new potential therapeutic target for the treatment of allergic asthma

Fahima Madouri, Valérie F.J. Quesniaux, Bernhard Ryffel, and Dieudonnée Togbe.

Revue Française de l'Allergologie, Volume 53, Issue 3, April 2013

Il s'agit d'une revue publiée lors du 8^{ème} Congrès Francophone d'Allergologie dans la "Revue Française de l'Allergologie" qui se focalise sur la cytokine TSLP en tant que cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'asthme allergique. Elle s'appuie sur les données de la littérature et sur un article publié par notre équipe dont je fais partie des auteurs qui se trouve également en annexe (Article 3).

TSLP, une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'asthme allergique

TSLP, a new potential therapeutic target for the treatment of allergic asthma

F. Madouri^a, V. Quesniaux^a, B. Ryffel^a, D. Togbe^{a,*}

^a INEM, CNRS, UMR 7355, immunologie et neurogénétique expérimentales et moléculaires, université d'Orléans, 3B, rue de la Férollerie, 45071 Orléans cedex 2, France

^b Artimmune SAS, 13, avenue Buffon, 45071 Orléans, France

Disponible sur Internet le 7 mars 2013

Résumé

L'asthme allergique est en nette expansion dans les pays industrialisés avec une augmentation à la fois de la prévalence et de la sévérité. Les mécanismes de sensibilisation et de déclenchement de l'asthme sont complexes. Cette pathologie est associée à une réponse immunitaire Th2 dans laquelle sont impliqués l'IL-4, IL-13, IgE, IL-5 et *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP). Une composante Th17 qui sécrète l'IL-17 et l'IL-22 a été également associée à l'asthme allergique. TSLP est une cytokine de type I associée au mécanisme cellulaire et moléculaire de l'asthme allergique. Dans cette revue, nous résumerons les fonctions de TSLP dans divers types cellulaires et son rôle dans les allergies, une attention particulière sera accordée aux cellules produisant l'IL-17 et IL-22 dans l'asthme allergique.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Asthme allergique ; Souris ; TSLP ; ILC2 ; Th17

Abstract

Allergic asthma is in clear expansion in industrialized countries, increasing both in prevalence and severity. The mechanisms of sensitization and the triggering of asthma are complex. This disease is associated with a Th2-cell immune response in which IL-4, IL-13, IgE, IL-5 and *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) are involved. A Th17 component, which secretes IL-17 and IL-22, has likewise been linked to allergic asthma. TSLP is a type I cytokine associated with the cellular and molecular mechanisms of allergic asthma. In this review, we will summarize the functions of TSLP on various cell types and its role in allergies, giving particular attention to cells producing IL-17 and IL-22 in allergic asthma.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords : Allergic asthma; Mice; TSLP; IL-17; IL-22

1. Introduction

La cytokine *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) a initialement été décrite comme le facteur de croissance et de maturation des cellules B immatures [1]. La liaison de la protéine TSLP à son récepteur (TSLPR) active une cascade de signalisation impliquant JAK1 et JAK2, ce qui a pour conséquence l'activation et la phosphorylation de STAT5 [2].

TSLP participe à l'induction de l'inflammation aiguë et chronique comme l'hypersensibilité de contact (dermatite atopique), l'arthrite rhumatoïde et l'asthme allergique [3]. Le rôle anti-infectieux de TSLP a été mis en évidence dans des modèles murins d'infection par des parasites intestinaux comme *Trichuris* [4]. La protéine TSLP est synthétisée par divers types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les mastocytes, les fibroblastes, les basophiles mais aussi par les cellules dendritiques activées [5]. En revanche, TSLP n'est pas synthétisée par les lymphocytes T, les neutrophiles, les lymphocytes B et les cellules endothéliales. TSLP est sécrétée par des cellules épithéliales bronchiques humaines ou murines en réponse à certains motifs microbiens comme le

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail: dtogbe@cnrs-orleans.fr, dieudo.togbe@artimmune.com (D. Togbe).

peptidoglycane, le LPS ou l'ARN double-brin (polyIC), mais aussi en réponse à des dommages tissulaires ou à des cytokines inflammatoires (IL-1 β ou TNF α) [6]. Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans le mécanisme de sensibilisation et de maintien de la réponse allergique en tant que cellules présentant l'antigène. Elles possèdent la capacité de moduler la réponse Th1/Th2 en stimulant la réponse Th2. Additionnée de manière exogène, TSLP provoque l'expression d'OX40L par les cellules dendritiques, ce qui correspond à leur activation et à l'induction de la polarisation de cellules T naïves en lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2) qui secrètent alors de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 [7]. Il apparaît notamment que TSLP joue un rôle clé dans l'induction de l'inflammation pulmonaire et dans la suppression des infections parasitaires. D'une manière générale, TSLP augmente la réponse Th2 tout en réduisant l'IL-12 et l'IFN produits par les cellules Th1 chez l'homme et la souris [8]. TSLP possède aussi des effets sur plusieurs acteurs cellulaires de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

2. Thymic stromal lymphopoietin et les cellules immunitaires innées

2.1. Thymic stromal lymphopoietin et les cellules dendritiques

TSLP stimule la maturation des cellules dendritiques (DC) myéloïdes qui expriment alors OX40L mais pas l'IL-10 et induit la sécrétion de cytokines Th2 par les cellules T CD4⁺ allogéniques. Cette fonction est dépendante de l'expression des récepteurs TSLPR et IL-7R à la surface des DC. La co-culture de DC et de cellules T CD4⁺ en présence de TSLP entraîne la prolifération des cellules T CD4⁺ mais pas leur différenciation. Cet effet de TSLP suggère son implication dans l'homéostasie des cellules T CD4⁺. TSLP agit aussi sur les DC humaines en augmentant l'expression de HLA-DR et des molécules de costimulation CD40, CD80, CD86 et CD83 ; mais aussi des chimiokines CCL17 (TARC) et CCL22 qui attirent les cellules Th2 [9].

2.2. Thymic stromal lymphopoietin et les cellules épithéliales

Bien que la cytokine TSLP ait été initialement identifiée dans le surnageant de culture provenant de lignées cellulaires stromales thymiques, les cellules épithéliales restent la source majeure de production de TSLP. L'administration par voie intra-trachéale d'extrait d'acariens induit la sécrétion de TSLP par les cellules épithéliales chez la souris. TSLP est exprimée de manière constitutive par les cellules épithéliales intestinales au niveau du côlon, jouant ainsi un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Dans le côlon, TSLP active les cellules dendritiques et favorise le développement des cellules T régulatrices qui expriment Foxp3. Les souris génétiquement déficientes pour TSLPR sont plus susceptibles à la colite expérimentale provoquée par un agent chimique qui est le sulfate de dextran sodique (DSS), ce qui confirme

l'importance de TSLP dans le maintien de l'homéostasie de la barrière épithéliale [10].

2.3. Thymic stromal lymphopoietin et les cellules lymphoïdes innées 2 (ILC2)

Les ILC2 constituent une nouvelle population de cellules innées, en plus des cellules dendritiques et des macrophages. Elles expriment à leur surface des marqueurs comme CD127, CD45, CD25, CD90, dépendent des facteurs de transcription ROR α et GATA3 et sécrètent l'IL-5, IL-9 et IL-13 en réponse à une stimulation par des cytokines comme l'IL-25 et l'IL-33 [11]. TSLP amplifie l'effet d'IL-33 sur les ILC2 en augmentant significativement les niveaux de production d'IL-5 et d'IL-13 in vitro. En effet, l'addition de TSLP exogène, en combinaison avec l'IL-33 mais pas avec l'IL-25, stimule les ILC2 à produire l'IL-5 et l'IL-13 in vitro. La neutralisation de TSLP et/ou de l'IL-33 sur des explants pulmonaires ex vivo réduit significativement la production d'IL-5 et d'IL-13 en réponse à l'allergène chez des souris génétiquement déficientes pour *Recombinase Activating Gene* (RAG) dépourvus de lymphocytes. En effet, l'administration d'allergènes comme la papaïne chez les souris *Rag1*^{-/-} et *Rag2*^{-/-} favorise la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 par les ILC2, probablement par l'intermédiaire d'IL-33 et de TSLP produites par les cellules épithéliales.

3. Thymic stromal lymphopoietin et les cellules de l'immunité adaptative

3.1. Thymic stromal lymphopoietin et les cellules T effectrices CD4⁺ (Th2)

Les lymphocytes Th2 sont différenciés en présence d'IL-4, d'IL-13 et TSLP et se caractérisent par leur capacité à sécréter les cytokines telles que IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et IL-25, les chimiokines CCL1, CCL2, CCL5, CCL22 et CCL24 sous le contrôle du facteur de transcription GATA 3 [12]. Les cellules Th2 sont impliquées dans les réponses allergiques et la défense de l'hôte contre les infections parasitaires. TSLP agit directement sur les cellules T CD4⁺ en augmentant leur production en cytokines Th2 telles que l'IL-4. Plusieurs études indiquent que la combinaison d'une activation par le TCR (stimulation avec anti CD3/CD28) et TSLP exogène induit la transcription d'IL-4 et la différenciation des lymphocytes Th2 [13].

3.2. Thymic stromal lymphopoietin et les cellules T régulatrices (T reg)

La muqueuse pulmonaire est en permanence exposée à divers antigènes environnementaux non pathogènes et certaines molécules immuno-stimulatrices ou inflammatoires comme les endotoxines. Pourtant, seulement une faible proportion de la population développe un asthme allergique. Cette disparité peut s'expliquer par un dysfonctionnement des lymphocytes T régulateurs dont le rôle est de maintenir l'état de tolérance vis-à-vis d'antigènes inoffensifs. Les cellules T régulatrices

(CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) jouent un rôle suppressif des réactions immunitaires. La fonction de TSLP sur une population particulière de cellules T régulatrices n'est pas bien documentée et semble assez complexe à comprendre. Chez l'homme, son effet passe par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui expriment fortement le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII), les molécules de costimulation CD80, CD86 et qui sécrètent l'IL-10 mais pas de TGF- β dans le thymus contrairement aux DC myéloïdes [14,15]. TSLP favorise donc la tolérance au niveau du thymus par l'intermédiaire des DC plasmacytoïdes.

3.3. Thymic stromal lymphopoietin et les cellules Th17

Les cellules Th17 produisant les IL-17, IL-22 et IL-21 ont été caractérisées et constituent une nouvelle population de cellules T en plus des cellules Th1, Th2 et T reg. Elles sont impliquées dans l'élimination de pathogènes, les maladies auto-immunes et les inflammations. Les effets d'IL-17A et d'IL-22 ont été évalués dans les modèles murins d'asthme allergique. Nos études ont permis de proposer un nouveau paradigme de dualité d'une cytokine dont la fonction dépend de son environnement cytokinique. En effet, nous avons démontré le rôle régulateur négatif de l'IL-22 sur la fonction de l'IL-17A au cours de la réaction inflammatoire allergique. Brièvement, l'inflammation pulmonaire allergique est exacerbée après

neutralisation de l'IL-17A chez des souris déficientes en IL-22 [16]. Une étude a récemment suggéré que TSLP supprime la différenciation de cellules Th17 *in vitro* et diminue le niveau d'IL-17 produit *ex vivo* par des explants de peau humaine [17]. Nous avons également montré que TSLP inhibe de façon significative l'expression et la production d'IL-17A *ex vivo* dans un modèle murin d'asthme allergique [18] et favorise la production d'IL-22 par les lymphocytes T CD4⁺.

3.4. Thymic stromal lymphopoietin dans l'asthme allergique

L'implication de TSLP dans le développement de la réponse Th2 et l'hyperréactivité bronchique est aujourd'hui bien décrite dans la littérature. L'inflammation pulmonaire allergique est diminuée chez les souris déficientes pour TSLPR ou réciproquement cette réponse allergique est augmentée chez les souris transgéniques qui sur-expriment TSLP. TSLP est impliquée dans la polarisation de lymphocytes T naïves en cellules Th2 via l'expression d'OX40L sur les cellules dendritiques. En effet, une augmentation du niveau de TSLP a été observée dans des modèles d'allergie respiratoire et d'inflammation de la peau [19]. Une augmentation de l'expression de TSLP au niveau des kératinocytes a été observée chez les patients présentant la dermatite atopique [9]. La neutralisation de TSLP inhibe l'hypersensibilité allergique

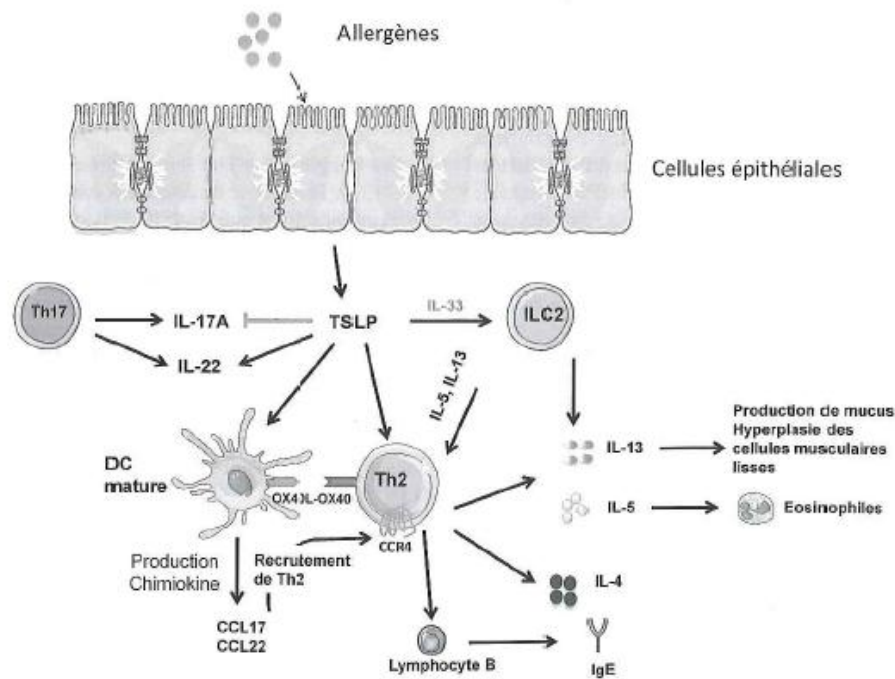


Fig. 1. Rôle de thymic stromal lymphopoietin (TSLP) dans l'allergie. Les allergènes peuvent activer directement les cellules épithéliales, ce qui induit la production de TSLP et IL-33 qui stimulent les ILC2 pour la sécrétion d'IL-5 et IL-13. TSLP sécrété par les cellules épithéliales active les cellules dendritiques qui expriment OX40L et déclenchent la polarisation des lymphocytes T naïfs en Th2. Ces derniers vont produire les cytokines Th2 comme les IL-4, IL-5 et IL-13. Les allergènes peuvent également activer l'expression par les cellules dendritiques de chimiokines attirant les lymphocytes Th2 telles que CCL17 et CCL22. L'interleukine 13 produite par les ILC2 et les cellules Th2 est responsable de la production de mucus et de l'hyperplasie des cellules musculaires lisses et par conséquent de l'hyperréactivité bronchique.

et la réponse Th2 spécifique de l'antigène dans la peau, ce qui suggère un rôle de TSLP dans le maintien de la réponse allergique [20]. Nos études montrent également une forte diminution des réponses immunitaires cellulaires et moléculaires caractéristiques de l'asthme allergique chez les souris génétiquement déficientes pour TSLPR (TSLPR^{-/-}). En effet, les caractéristiques de l'asthme allergique comme le recrutement cellulaire d'éosinophiles et de lymphocytes, l'expression des cytokines Th2 telles que IL-13 et IL-33 ainsi que des chimiokines CCL11, CCL17, CCL22 et CCL24 sont réduites chez les souris TSLPR^{-/-}. Nous avons aussi montré qu'au-delà de son effet sur les cellules Th2, TSLP favorise également la production d'IL-22 tout en inhibant la production d'IL-17A en condition allergisante impliquant les allergènes de type protéase ; un extrait d'acariens HDM ou la papaïne. Les populations cellulaires IL-22⁺CD4⁺ sont diminuées et celles exprimant IL-17A⁺CD4⁺ sont augmentées dans les poumons des souris déficientes pour TSLPR (Fig. 1) [18].

4. Conclusions

Ces dernières années, les données de la littérature ont clairement montré le rôle crucial joué par TSLP dans le contrôle de la réponse immunitaire innée et adaptative dans les allergies. Notamment, les résultats générés dans les modèles expérimentaux murins ont contribué significativement à la compréhension des fonctions de TSLP dans l'asthme allergique et l'homéostasie de la barrière intestinale. Le développement de molécules thérapeutiques ciblant TSLP ou l'axe OX40/OX40L pourrait constituer une approche thérapeutique très prometteuse pour le traitement de l'asthme allergique.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Friend SL, Hosler S, Nelson A, Foxworth D, Williams DE, Farr A. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol* 1994;22:321–8.
- [2] Rochman Y, Kashyap M, Robinson GW, Sakamoto K, Gomez-Rodriguez J, Wagner KU, et al. Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:19455–60.
- [3] Zhang Y, Zhou B. Functions of thymic stromal lymphopoietin in immunity and disease. *Immunol Res* 2012;52:211–23.
- [4] Taylor BC, Zaph C, Troy AE, Du Y, Guild KJ, Comeau MR, et al. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med* 2009;206:655–67.
- [5] Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Fang C, Cousins D, et al. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 2008;181:2790–8.
- [6] Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chertier S, et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* 2007;204:253–8.
- [7] Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Deshpande GJ, Watanabe N, et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2007;202:1213–23.
- [8] Watanabe N, Hanabuchi S, Marloie-Provost MA, Antonenko S, Liu YJ, Soumelis V, et al. Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. *Blood* 2005;105:4749–51.
- [9] Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Honev B, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002;3:673–80.
- [10] Ziegler SF, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol* 2010;11:289–93.
- [11] Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells – how did we miss them? *Nat Rev Immunol* 2013;13:75–87.
- [12] Virchow JC, Barnes PJ. Asthma. *Semin Respir Crit Care Med* 2012;33:577.
- [13] Omori M, Ziegler S. Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol* 2007;178:1396–404.
- [14] Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Cao W, Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005;436:1181–5.
- [15] Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, et al. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol* 2010;184:2999–3007.
- [16] Besnard AG, Sabat R, Dumoutier L, Renaud JC, Willart M, Lambrecht B, et al. Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1153–63.
- [17] Bogiatzi SI, Guillot-Delost M, Cappuccio A, Bichet JC, Chouchane-Mlik O, Donnadieu MH, et al. Multiple-checkpoint inhibition of thymic stromal lymphopoietin-induced TH2 response by TH17-related cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:233–40.
- [18] Togbe D, Fauconnier L, Madouri F, Marchiol T, Chenuet P, Ledru A, et al. Thymic stromal lymphopoietin enhances Th2/Th22 and reduces IL-17A in protease allergen induced airways lung inflammation. *ISRN Allergy* 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/971036>.
- [19] Han H, Xu W, Headley MB, Jessup HK, Lee KS, Omori M, et al. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-mediated dermal inflammation aggravates experimental asthma. *Mucosal Immunol* 2012;5:342–51.
- [20] He R, Oyoshi MK, Garibyan L, Kumar L, Ziegler SF, Geha RS. TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:11875–80.

Annexe 2 (Article 3): TSLP est requis pour le développement des lymphocytes Th2/Th22 et réduit la production d'IL-17A dans l'inflammation pulmonaire allergique induite par des protéases.

Thymic Stromal Lymphopoietin Enhances Th2/Th22 and Reduces IL-17A in Protease-Allergen-Induced Airways Inflammation

Dieudonnée Togbe, Louis Fauconnier, **Fahima Madouri**, Tiffany Marchiol, Pauline Chenuet, Nathalie Rouxel, Aurélie Ledru, François Erard, Valerie Quesniaux, and Bernhard Ryffel

ISRN Allergy. 2013 Feb 7;2013:971036. doi: 10.1155/2013/971036. Print 2013.

Lors de ma thèse, j'ai réalisé des expériences figurant dans cet article qui montre le rôle régulateur de TSLP dans l'asthme allergique induit par des protéases comme OVA, HDM ou la papaïne. TSLP est une cytokine produite entre autre par les cellules épithéliales suite à un dommage ou a un stress cellulaire. Il est notamment surexprimé dans les biopsies de bronches de patients asthmatiques. Cette cytokine est décrite en détail dans la revue de l'annexe 1.

Nous démontrons dans cet article que les souris déficientes pour TSLPR traitées avec l'allergène d'acarien HDM ou avec la papaïne présentent une réduction du phénotype allergique. De plus, des expériences réalisées sur le modèle d'inflammation pulmonaire à l'ovalbumine montrent une réduction de la prise en charge de l'antigène par des DC déficientes pour TSLP.

En conclusion ces résultats suggèrent que TSLPR joue un rôle important dans la réponse allergique et pourrait être une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'asthme allergique.

Research Article

Thymic Stromal Lymphopoietin Enhances Th2/Th22 and Reduces IL-17A in Protease-Allergen-Induced Airways Inflammation

Dieudonné Togbe,¹ Louis Fauconnier,¹ Fahima Madouri,^{2,3}
Tiffany Marchiol,¹ Pauline Chenuet,¹ Nathalie Rouxel,¹ Aurélie Ledru,¹ François Erard,^{2,3}
Valerie Quesniaux,^{2,3} and Bernhard Ryffel^{2,3}

¹ Artimmune SAS, 13 avenue Buffon, 45071 Orléans, France

² INEM, CNRS, UMR 7355, University of Orléans, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orléans Cedex 2, France

³ Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, 7701 Rondebosch, South Africa

Correspondence should be addressed to Dieudonné Togbe; dieudo.togbe@artimmune.com

Received 5 October 2012; Accepted 24 October 2012

Academic Editors: M. R. Comeau, A. Fukushima, and B. F. Gibbs

Copyright © 2013 Dieudonné Togbe et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is induced in allergic skin and lung inflammation in man and mice. **Methods.** Allergic lung inflammation induced by two proteases allergens HDM and papain and a classical allergen ovalbumin was evaluated *in vivo* in mice deficient for TSLPR. Eosinophil recruitment, Th2 and Th17 cytokine and chemokine levels were determined in bronchoalveolar lavage fluid, lung homogenates and lung mononuclear cells *ex vivo*. **Results.** Here we report that mice challenged with house dust mite extract or papain in the absence of TSLPR have a drastic reduction of allergic inflammation with diminished eosinophil recruitment in BAL and lung and reduced mucus overproduction. TSLPR deficient DCs displayed diminished OVA antigen uptake and reduced capacity to activate antigen specific T cells. TSLPR deficient mice had diminished proinflammatory IL-1 β , IL-13, and IL-33 chemokines production, while IL-17A, IL-12p40 and IL-10 were increased. Together with impaired Th2 cytokines, IL-17A expressing TCR β ⁺ T cells were increased, while IL-22 expressing CD4⁺ T cells were diminished in the lung. **Conclusion.** Therefore, TSLPR signaling is required for the development of both Th2 and Th22 responses and may restrain IL-17A. TSLP may mediate its effects in part by increasing allergen uptake and processing by DCs resulting in an exacerbated asthma.

1. Introduction

The allergic inflammatory response is characterized by a predominant Th2-cell pathway, which is initiated by the uptake of allergens by professional antigen presenting cells (APCs) that present selected peptides on MHC class II molecules to naive T cells, together with isotype switching of B cells to generate IgE antibodies specific for common environmental allergens [1]. The cytokines associated with Th2 response are IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, and IL-33 [2, 3]. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) was first identified as a growth-promoting factor produced by mouse thymic stromal cells that supported the development of immature B cells to the B220⁺/IgM⁺ stage [4]. TSLP is a type I cytokine

that acts via the heteromeric receptor consisting of IL-7R α and a TSLP-specific subunit, TSLP receptor (TSLPR) [5, 6] signaling via JAK1 and JAK2 to mediate the activation of STAT5A and STAT5B [7]. TSLPR has homology to the common cytokine receptor γ -chain, γ_c , a component of the receptors for IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21 [8].

TSLP is expressed by a range of cell types, including epithelial cells, fibroblasts, keratinocytes, mast cells, protease-activated basophils, human CD68⁺ macrophages, and myeloid DCs (mDCs) whereas it is not produced by other lympho-hematopoietic cells, including neutrophils, B cells, T cells, monocytes, plasmacytoid DCs (pDCs), and endothelial cells [9, 10].

hydrogen peroxide (H_2O_2) using the protocol by Van Oosterhout and colleagues [23]. The substrate solution consisted of 10 mM OPD in 0.05 M Tris/HCl-buffer (pH = 8) and 4 mM H_2O_2 (BDH, Poole, UK). Substrate solution was added to samples in a 96-wells microplate (Greiner) and incubated at 37°C for 30 min. Duplicate incubations were carried out in the absence and presence of the EPO inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole (AMT, 2 mmol/L). The absorbance was then measured at 490 nm (Flow Labs, Irvine, UK). Results are expressed as OD 490 nm and were corrected for the activity of other peroxidases, which were not inhibited by AMT.

2.7. Quantification of Cytokines. The lungs were homogenized for 30 s using a Polytron (Kinematic AG, Luzern, Switzerland) and the cell debris were eliminated by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min. IL-1 β , IL-13, IL-33, TSLP, CCL11, CCL17, CCL22, and CCL24 concentrations in BAL or lung homogenate supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using commercial kits from R&D (Abingdon, UK). IL-10, IL-12p40, IL-17A, and IFN γ were determined by Bio-Plex mouse Cytokine Group I 23-Plex on MagPix (Luminex, Bio Rad) according to the manufacturers' instructions.

2.8. Bone Marrow Derived Dendritic Cells (BMDCs) Culture. Murine bone marrow cells were isolated from femurs of wild type and TSLPR $^{-/-}$ mice and differentiated into myeloid dendritic cells (DCs) by culturing at 1×10^6 cells/mL for 10 days in RPMI medium supplemented with 10% FCS (Hyclone), non-essential amino-acids, 0.05 μ g/mL asparagine, MEM vitamins, sodium pyruvate, gentamycin (2 μ M, Invitrogen), penicillin (100 U/mL, Gibco, Invitrogen), 10 mg/mL streptomycin, 2-mercaptoethanol 50 μ M and 4% J558L cell-conditioned medium as a source of GM-CSF (change medium on days 3, 6, and 8). Dendritic cells were treated with 100 μ g/mL OVA-FITC (Molecular probes, France) for 2 h and analyzed by FACS. The data are given as the mean fluorescence intensity (MFI).

2.9. In Vitro T-Cell Proliferation. Lymph node CD4 $^{+}$ T cells were purified from OT2 mice by magnetic cell Sorting (Dyna, Invitrogen). CD4 $^{+}$ T cells (10^5 cells) were co-cultured with 10^4 WT or TSLPR $^{-/-}$ dendritic cells preloaded with OVA peptide (10 μ g/mL, 2 h). T cell proliferation was assessed by CFSE staining (0.5 μ M; Molecular probes, Invitrogen).

2.10. Lung Mononuclear Cells Isolation. Lung mononuclear cells were isolated from mice 24 h after the last challenge as described [24]. Briefly the aorta and the inferior vena cava were sectioned and the lungs were perfused with saline. The lobes of the lungs were sliced into small cubes and then incubated for 20 min in 1 mL RPMI 1640 solution containing DNase I (1 mg/mL) and collagenase IV (2 mg/mL) (Sigma-Aldrich). Lung mononuclear cells were separated by centrifugation on Percoll (Amersham Biosciences) gradients (37%). Isolated lung mononuclear single cells were plated in round bottom 96-well plates (2×10^6 /mL) and restimulated 4 h *in vitro* with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

(50 ng/mL) and ionomycin (750 ng/mL; both from Sigma-Aldrich) in complete medium (IMDM supplemented with 5% (vol/vol) FCS, L-glutamine (2 μ M), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), and β -mercaptoethanol (50 nM) all from Invitrogen).

2.11. Flow Cytometry Analysis on Lung Mononuclear Cells. Cell suspensions from lung were restimulated *in vitro* for 4 h in complete medium with PMA (50 ng/mL) and ionomycin (750 ng/mL; both from Sigma-Aldrich) in presence of Brefeldine A (GolgiPlug, BD Biosciences, France). To prevent a specific binding to FcR, 2.4.G2 blocking purified antibody was used. After 4 h, cells were stained with the following monoclonal antibodies, FITC-labeled TCR $\gamma\delta$, biotin-labeled TCR β , V450-labeled CD4, and APC-Cy7-labeled CD8 α . After washing, cells were permeabilized for 20 min with cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences, France) and stained with APC labeled IL-5, PE-labeled IL-17A and PerCPeFluor710—labeled IL-22. Samples were analyzed on a BD CANTO II flow cytometer. Fluorescence data were acquired by using DIVA software (BD Bioscience, France) and analyzed using FlowJo software (Treestar).

2.12. Statistical Analysis. The data are presented as the mean \pm SEM with $n = 6-8$ animals per condition. The significance of differences between two groups was determined by one way ANOVA (non parametric test) using Prism software. Statistical significance was reported if $P < 0.05$ was achieved, * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

3. Results

3.1. Reduced Eosinophil Recruitment in Response to House Dust Mite Allergen. HDM is a major source of allergens in allergic patients and cause allergic airway inflammation resembling human asthma in mice by facilitating barrier disruption, inflammation, and allergen sensitization of the airways through TLR4-dependent innate and acquired immunity [20, 25, 26]. Previous studies demonstrated reduced allergic response to ovalbumin in TSLPR $^{-/-}$ mice [11], here it was asked whether the inflammatory response to the clinically relevant allergen HDM is dependent on TSLPR signaling. Mice were immunized twice and challenged on days 14, 15 and 16 by intranasal instillation of HDM and the BAL fluid and lung tissues were analyzed on day 17. Eosinophil, neutrophil and lymphocyte influx in the alveolar space were significantly reduced in TSLPR $^{-/-}$ mice while macrophages were unchanged (Figures 1(a)–1(d)). Furthermore eosinophil peroxidase activity (EPO) was also reduced in the lung tissue (Figure 1(e)).

IL-13 and IL-33 are known to drive eosinophil maturation and infiltration, mucus production and bronchial hyperre-activity. To investigate whether TSLP signaling disruption could affect cytokine production, we induced local airway allergic inflammation with HDM on TSLPR $^{-/-}$ mice. The analysis of cytokines in lung homogenate revealed a drastic reduction of IL-1 β , IL-13, and IL-33 in the absence of TSLPR signaling suggesting a significant reduction of Th2 associated

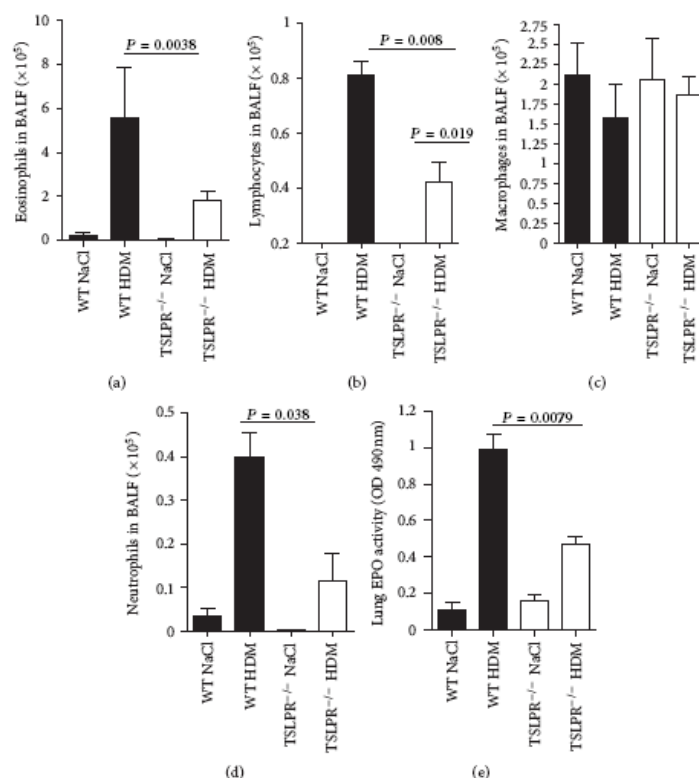


FIGURE 1: Reduced eosinophils influx in TSLPR^{-/-} mice during HDM induced allergic asthma lung inflammation. HDM sensitized WT and TSLPR^{-/-} mice (C57BL/6 background) were challenged three times with HDM inhalation. 24 h after the third challenge, the number of eosinophils (a), the lymphocytes (b), macrophages (c), and neutrophils (d) were determined in BALF and EPO activity in lung tissue (e). These experiments were performed twice ($n = 8$ mice per group). One representative experiment is shown. Values are the mean \pm SEM of 8 mice per group.

local response to HDM (Figures 2(a)–2(c)). Furthermore the chemokines CCL11, CCL17, CCL22, and CCL24 were significantly reduced upon HDM allergen exposure (Figures 2(e)–2(g)) underscoring a defect of eosinophil recruitment in the absence of TSLPR. The absence of TSLP upregulation in TSLPR^{-/-} mice suggests an autocrine loop of TSLP production in the lung (Figure 2(d)). Thus, the data extend the notion of a critical role of TSLPR to generate a Th2 cytokine/chemokine milieu.

3.2. Eosinophilic Lung Inflammation Depends on TSLPR. In view of an important role of TSLPR in HDM induced allergic inflammation we examined the lung tissue at day 17. HDM immunized and challenged WT mice developed a robust inflammation with abundant eosinophils and mucus production in the bronchial epithelial cells (Figures 3(a) and 3(b)). By contrast eosinophilic inflammation and mucus production

was largely abrogated in the absence of TSLPR. Therefore, TSLPR signaling is required for an allergic inflammatory response to HDM.

3.3. TSLPR Is Required for the Development of Innate Type Airway Inflammation Induced by Papain. Papain, a cysteine protease, was shown to preferentially induce an IgG1 response and results in mast cell degranulation, both features typical of an allergic reaction [27]. It has recently been shown that the protease papain could induce asthma like symptoms in RAG-deficient mice [22, 28]. This effect is mediated by innate lymphocytes also known as natural helper cells or nuocytes cells. Therefore we tested whether TSLPR signaling is involved in papain induced lung inflammation. Intranasal administration of papain into TSLPR^{-/-} mice showed a dramatic decrease of eosinophils in BAL fluid and eosinophil peroxidase activity in the lung, while lymphocyte,

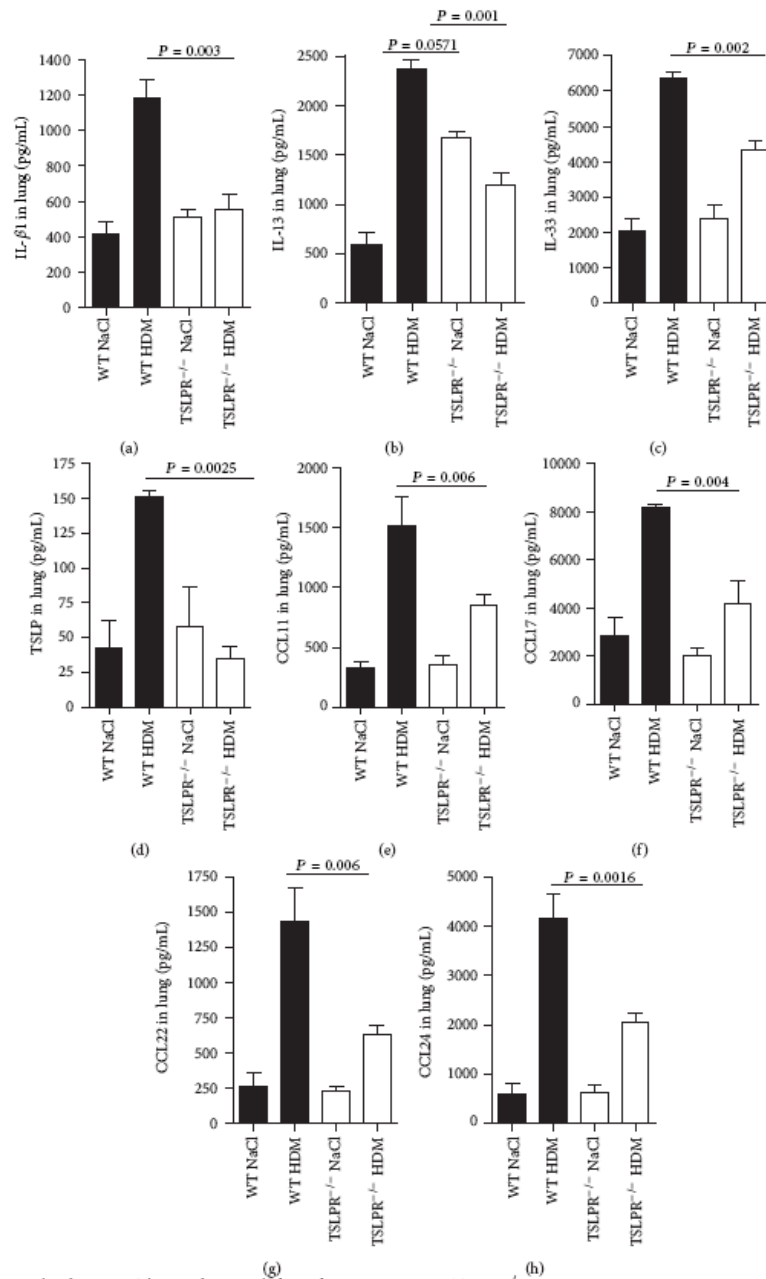


FIGURE 2: Decreased pulmonary Th2 cytokine and chemokine responses in TSLPR^{-/-} mice in response to HDM. Mice were immunized and challenged with HDM as before. IL-1 β , IL-13, IL-33, TSLP, CCL11 (Eotaxin-1), CCL17 (TARC), CCL22 (MDC), and CCL24 (Eotaxin-2) were measured in the lung homogenate by ELISA (a-h) from HDM treated WT and TSLPR^{-/-} mice at 24 h after the third challenge. These experiments were performed twice ($n = 8$ mice per group). One representative experiment is shown. Values are the mean \pm SEM of 8 mice per group. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

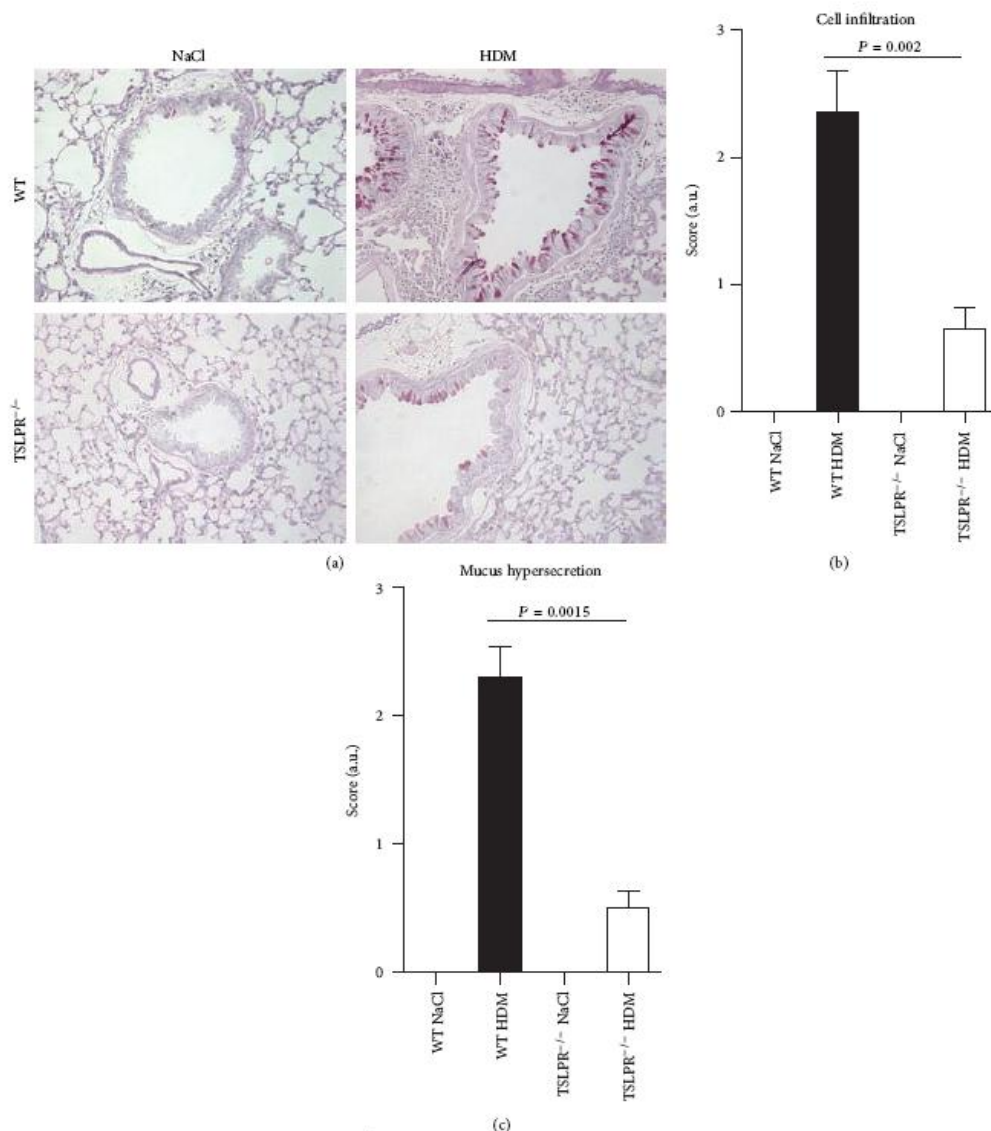


FIGURE 3: Reduced lung inflammation in TSLPR^{-/-} mice in response to HDM. The formalin-fixed lung sections were stained with periodic acid Schiff reagent (PAS) to visualize mucus (a). Magnification ×20. Representative sections from WT saline control, HDM treated WT, and TSLPR^{-/-} mice are shown. A semi-quantitative histological assessment of cell infiltration and mucus hypersecretion was performed by two independent observers (b). A scale from 0 to 3 is given on the axis. These experiments were performed twice (*n* = 8 mice per group). One representative experiment is shown. Values are the mean ± SEM of 8 mice per group.

macrophage and neutrophil recruitment into BALF was not affected (Figures 4(a)–4(e)). Histological examination revealed that lung inflammation in papain treated TSLPR^{-/-} mice was substantially reduced than in WT mice (Figures 4(f)

and 4(g)). Interestingly, papain induced Th2 and inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-13, IL-33, and TSLP (Figures 5(a)–5(d)) were profoundly impaired in TSLPR^{-/-} mice as well as the chemokines CCL11, CCL17, CCL22, and CCL24

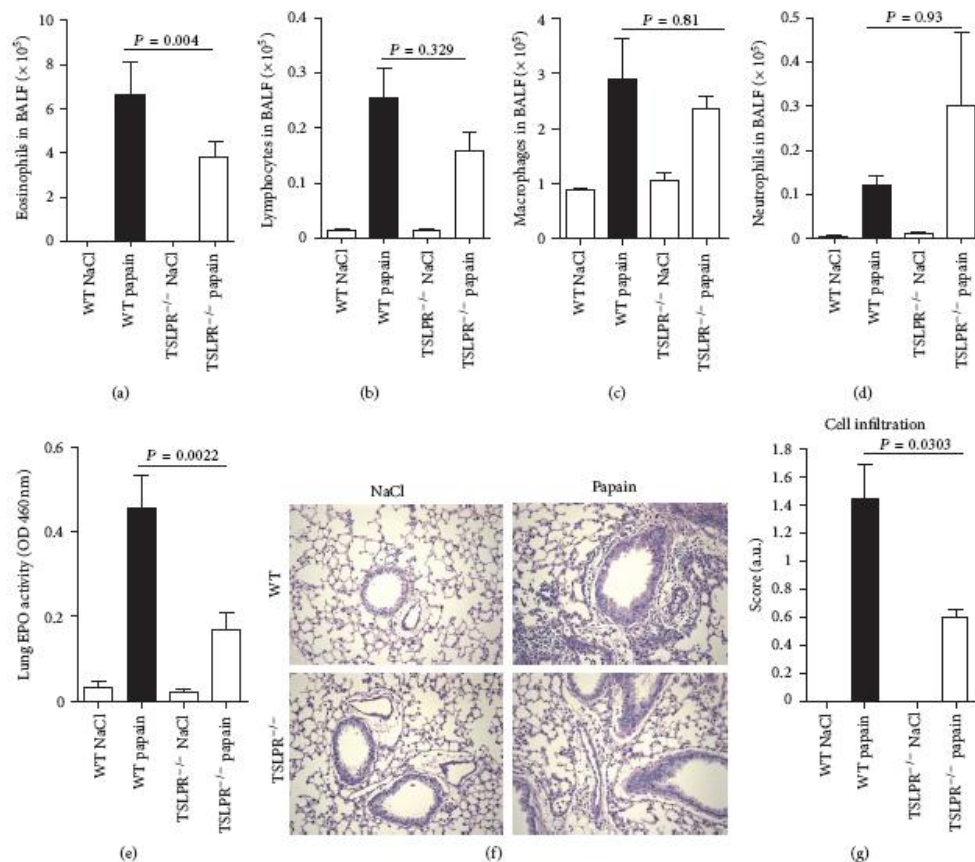


FIGURE 4: TSLPR is essential for the development of innate type airway inflammation induced by papain. Mice were exposed daily to 25 μ g papain for 3 days and analyzed 24 h after the last intranasal instillation. The number of eosinophils (a), lymphocytes (b), macrophages (c), and neutrophils (d) were determined in BALF as well as EPO activity in lung tissue (e) was determined 24 h after the last papain or saline control administration in wild-type (WT) and TSLPR^{-/-} mice. Lung sections stained with Hematoxylin-Eosin (HE) (20x magnification) and score of the severity of inflammation and mucus production at 24 h after the last papain or PBS inhalation are shown (f-g). These experiments were performed twice ($n = 8$ mice per group). One representative experiment is shown. Values are the mean \pm SEM of 8 mice per group.

(Figures 5(e)–5(h)). Therefore our data demonstrate that TSLP is required in papain induced eosinophil recruitment, pulmonary inflammation and Th2 cytokine production.

3.4. Reduced Antigen Uptake in DCs and T Cell Response in the Absence of TSLPR. In view of the data suggesting a critical and autocrine effect of TSLP via TSLPR expressing DC [29], we investigated antigen uptake by DC in presence or absence of TSLPR and the subsequent T cell response. For this investigation we used OVA as antigen in order to use peptide specific OT2 T cells since HDM TCR transgenic are not established to assess T cell proliferation. We found reduced uptake of FITC-labeled OVA by TSLPR^{-/-} DC (Figure 6(a)).

Furthermore the proliferation of the OVA peptide specific OT2 T cells in response to OVA peptide pulsed TSLPR^{-/-} DC was reduced as compared to WT DC (Figure 6(b)). Finally we verified the previous data that eosinophil recruitment in the bronchoalveolar space in OVA immunized and challenged TSLPR^{-/-} mice (Figure 6(c)). Therefore, TSLPR signaling in DCs is required for antigen uptake and presentation to activate CD4 T cells, consistent with a recent report demonstrating TSLP production and response by DC [29]. Since Th17 cell differentiation [15] and allergic lung inflammation [30, 31] contribute to allergic inflammation, we asked whether TSLPR signaling may contribute to Th17 cell response.

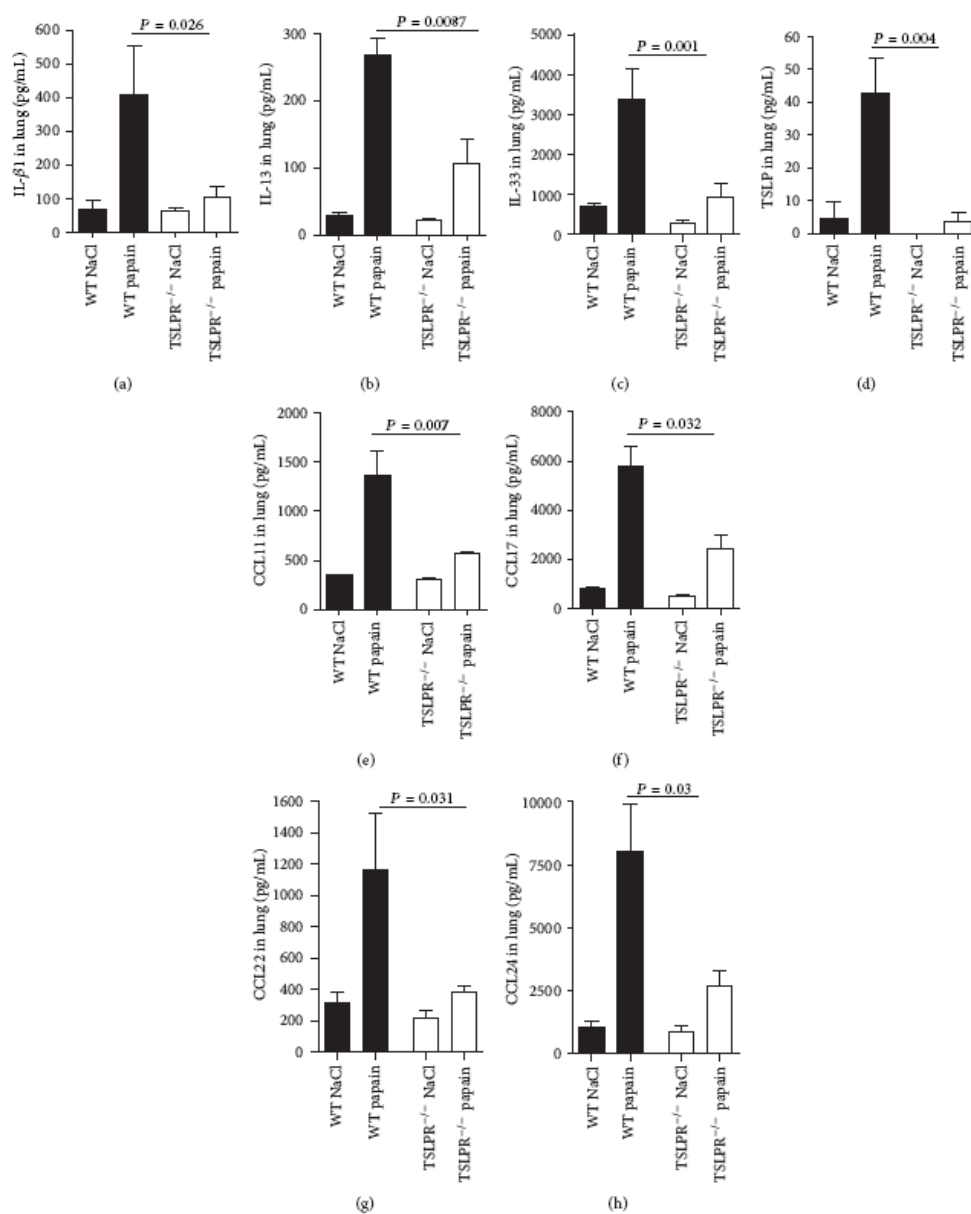


FIGURE 5: Diminished cytokine and chemokine expression in TSLPR^{-/-} mice in innate type of lung inflammation induced by papain. IL-1 β , IL-13, IL-33, TSLP, CCL11 (Eotaxin-1), CCL17 (TARC), CCL22 (MDC), and CCL24 (Eotaxin-2) in the lung homogenate after papain exposure were determined by ELISA (a-h). These experiments were performed twice ($n = 8$ mice per group). One representative experiment is shown. Values are the mean \pm SEM of 8 mice per group.

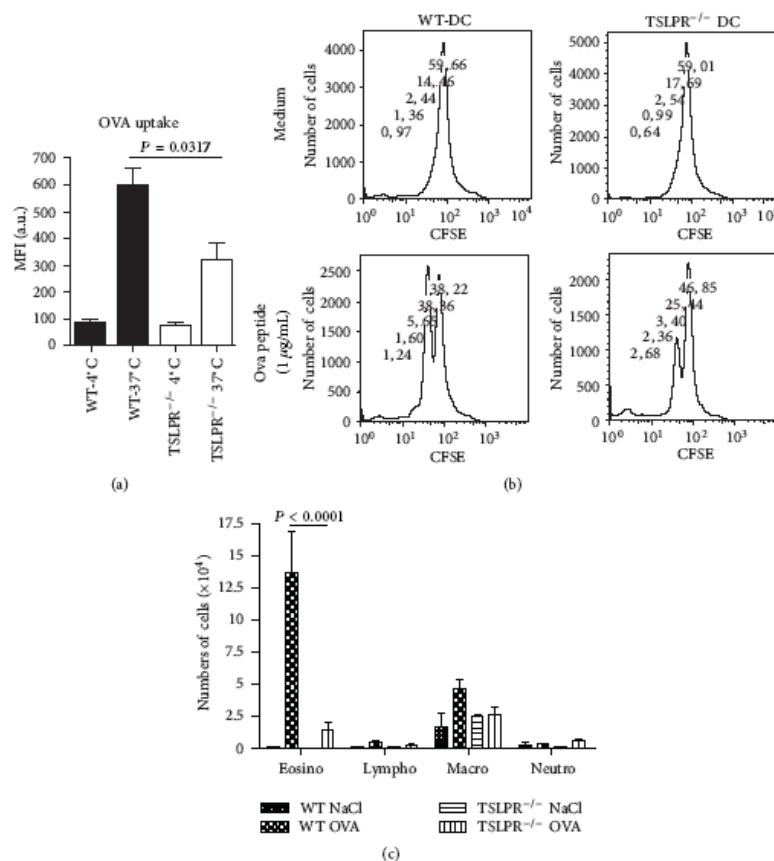


FIGURE 6: Reduced antigen uptake and eosinophils influx in TSLPR^{-/-} mice upon OVA induced allergic asthma model. Dendritic cells were differentiated *in vitro* from naive bone marrow derived cells. Uptake of OVA-FITC by dendritic cells after 2 h was analyzed by FACS (100 μ g/mL). The data are given as the mean fluorescence intensity (MFI). OVA peptide specific T cell proliferation was assessed by coculture of DC from WT or TSLPR^{-/-} mice loaded with OVA peptide (10 μ g/mL) with CFSE labelled CD4⁺ OT2 T cells (b). Critical role of TSLPR signalling for allergic inflammatory cell recruitment in BALF in OVA immunized and challenged mice (c). OVA sensitized WT and TSLPR^{-/-} mice were challenged three times with OVA instillation. 24 h after the third challenge, eosinophil, lymphocyte, macrophage, and neutrophil recruitment in BAL was determined. These experiments were performed twice ($n = 8$ mice per group). One representative experiment is shown. Values are the mean \pm SEM. of 8 mice per group.

3.5. Enhanced TCR β ⁺IL-17A⁺ and Reduced CD4⁺IL-22⁺ T Cells Recruitment in the Absence of TSLPR. We reported that IL-17A is required [32, 33] and IL-22 reduces the allergic responses [34, 35]. Therefore, we asked whether IL-17A expression in T cells from the lung of OVA or HDM immunized and challenged mice is altered. Pulmonary IL-17A⁺TCR α β ⁺ and IL-17A⁺TCR γ δ ⁺ cells were significantly increased in WT mice, but the recruitment of the TCR α β ⁺IL-17A⁺ cells augmented much more in the absence of TSLPR (Figures 7(a)–7(h)).

To address the mechanisms underlying increased IL-17A level and diminished Th2 response in TSLPR^{-/-} mice, we examined the levels of cytokines shown to promote IL-17A level and regulatory T cells in the airways. Analysis of IL-12p40, IFN γ , and IL-10 in the lung homogenate revealed that IL-12p40 and IL-10 levels were increased in TSLPR^{-/-} mice treated with HDM, while IFN γ level was not detectable (Figures 7(i)–7(h)).

Since we previously reported a cross-regulation of IL-22 and IL-17 [34], we investigated the expression of IL-22

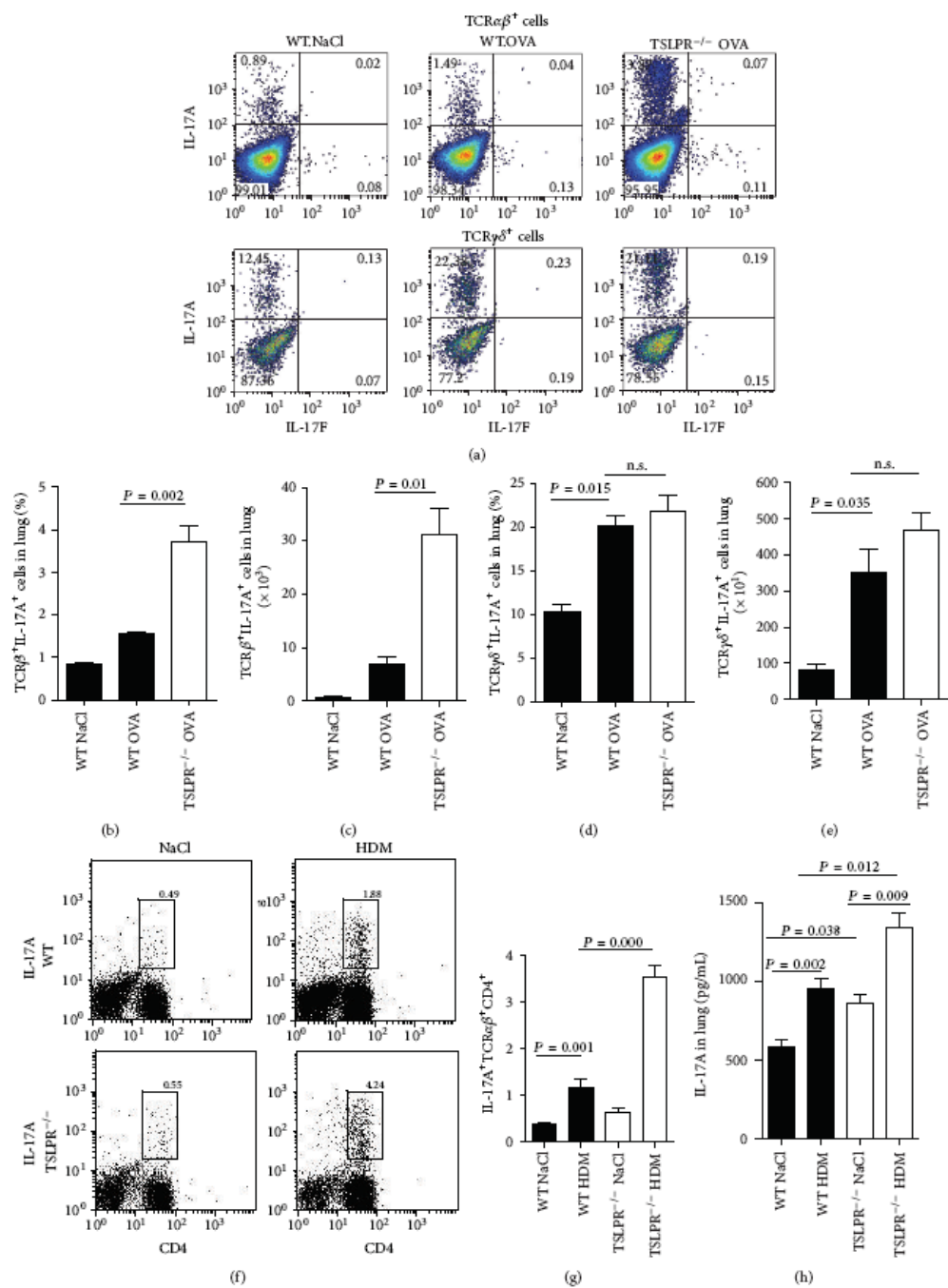


FIGURE 7: Continued.

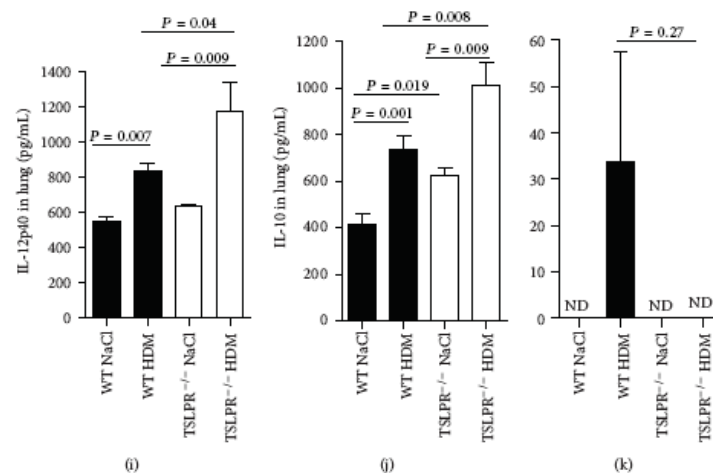


FIGURE 7: Increased pulmonary IL-17A⁺ cell populations in the absence of TSLPR. Lung mononuclear cells from OVA or HDM sensitized and challenged WT and TSLPR^{-/-} mice were isolated and restimulated for 4 h with PMA (50 ng/mL) and ionomycin (750 ng/mL) followed by membrane staining of TCRαβ and TCRγδ. Representative dot plot, frequency and absolute numbers of IL-17A⁺ producing T cells gated either on TCRαβ⁺ or TCRγδ⁺ T cell populations (a–e) are shown for OVA model. Representative dot plot and the frequency of IL-17A⁺ producing cells gated on TCRαβ⁺ T cell populations (f, g), IL-17A (h), IL-12p40 (i), IL-10 (j) and IFNγ (k) levels in lung supernatant from HDM treated WT and TSLPR^{-/-} mice are shown. Values are the mean ± SEM, of 6–8 mice per group.

a pulmonary T cells in the absence of TSLPR. We found a significant reduction of total CD4⁺IL-22⁺ T cells from the lung of TSLPR^{-/-} mice, while the total lung CD4⁺IL-5⁺ T cells were not significantly reduced (Figures 8(a) and 8(b)).

Therefore, TSLPR signaling is involved in the balance of Th17/Th22, in favor of the development of the Th22 subset, suggesting that physiologically TSLP dampens IL-17A and enhances IL-22 production. Based on our previous work showing a reciprocal role of IL-17A and IL-22 [34], the altered balance of IL-17A and IL-22 may contribute to the diminished allergic lung response.

4. Discussion

Several studies linked TSLP to lung inflammation and helminth infection [18, 19, 36], although the role of TSLP in airway inflammation using clinically relevant protease allergens HDM and papain have not been yet addressed.

Here we demonstrate that the allergic inflammatory response to protease allergens HDM or papain is dependent on TSLPR signaling. Proteases are important components of many allergens and thought not only to disrupt mucosa integrity but also activate airway epithelial cells [20]. Our results demonstrate impaired allergic lung inflammation and Th2 response with lower eosinophil influx and reduced IL-1β, IL-13 and IL-33 levels in the airways of TSLPR deficient mice. These findings were consistent with previous studies which demonstrate that TSLP may recruit eosinophils to sites of Th2 cytokine-associated inflammation by upregulating the common myeloid marker CD11b and the integrin αLβ2 ligand ICAM-1 on eosinophils [15].

Dendritic cells are known to play a crucial role in allergic lung inflammation and are essential for T cell activation and Th2 cell differentiation and recruitment into the airways and trigger local Th2 cytokine production [37, 38]. We demonstrate reduced antigen uptake by myeloid TSLPR deficient DC and defective help for T cells measured by diminished T cell proliferation. Therefore, the defects in dendritic cell functions may affect Th2 cells differentiation, cytokines and chemokines productions in the lung of TSLPR-deficient mice.

While the role of TSLP on Th2 response is established, its effect on IL-17A and IL-22 cell response is novel. We have established a regulatory role for IL-17A and IL-22 in allergic asthma [32, 34, 35]. Our study in TSLPR deficient mice suggests that TSLPR signalling inhibits IL-17A expressing T cells and enhances the IL-22⁺ T cell response in the lung. These findings are novel and consistent with previous data demonstrating that IL-22 inhibits allergic lung inflammation by regulating IL-17A expression [34, 35].

IL-10 has broad immunosuppressive and anti-inflammatory actions relevant to the inhibition of asthma pathology. IL-10 has been found to be essential for effective suppression of allergic responses in the lung [39, 40]. IL-10 is a potent inhibitor of proinflammatory cytokine and acts on antigen-presenting cells to dampen T cell activation, including Th2 cells [41, 42]. Our results demonstrate increase IL-10 levels in the lung supernatant of TSLPR^{-/-} mice treated with HDM compared to WT mice. Therefore the data suggest TSLP modulates IL-10 and this might contribute to the inhibition of allergic inflammation in TSLPR^{-/-} mice.

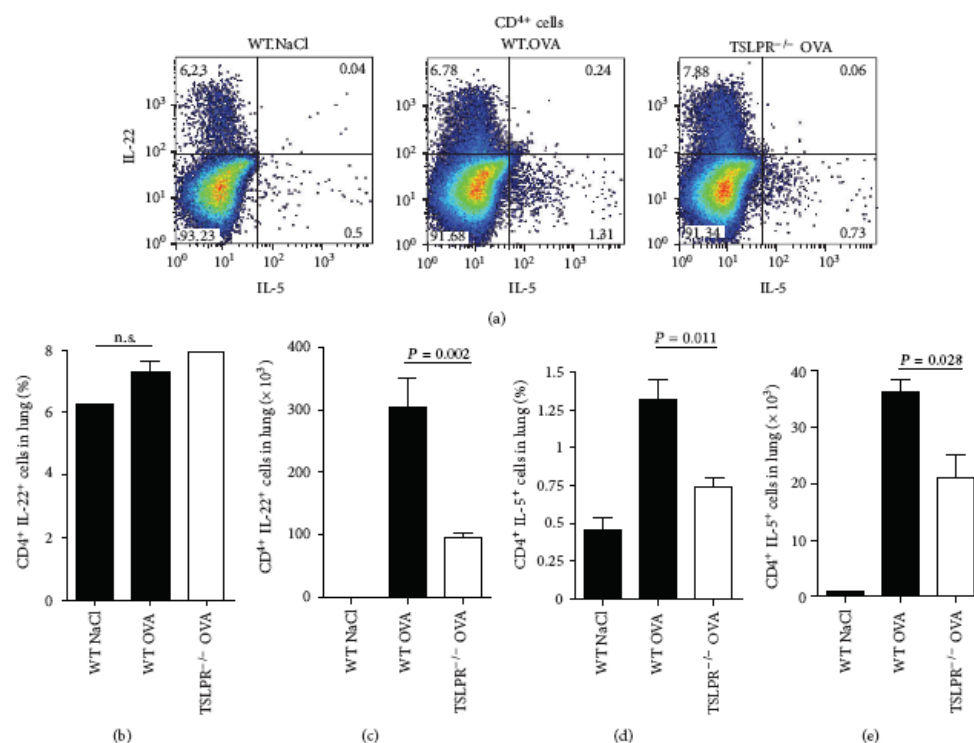


FIGURE 8: Reduced pulmonary IL-5⁺ and IL-22⁺ cell populations in the absence of TSLPR. Lung mononuclear cells from OVA sensitized and challenged WT and TSLPR^{-/-} mice were isolated and restimulated for 4 h with PMA (50 ng/mL) and ionomycin (750 ng/mL) followed by extracellular staining of TCR $\gamma\delta$ and CD4. Representative dot plot, the frequency and the absolute numbers of IL-5⁺ and IL-22⁺ producing cells gated on TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺ T cell populations (a-e) are shown. Values are the mean \pm SEM of 6 mice per group.

These findings add to the complexity of the regulation of an allergic response where TSLPR signaling plays an important part [18, 36, 43, 44]. Furthermore, TSLPR dependent regulation of innate lymphoid cells producing IL-22 may contribute to the inflammatory response in the lung [45] and intestinal tract [46]. Therefore our data support the notion that TSLPR signaling in myeloid DC is required for T cell differentiation into Th2 and Th22 cells, which may control the IL-17A response.

Abbreviations

BAL: Bronchoalveolar lavage
EPO: Eosinophil peroxidase
HDM: House dust mite
OVA: Ovalbumin
TSLP: Thymic stromal lymphopoietin
PAS: Periodic acid Schiff.

Conflict of Interests

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM allergy DAL 2007 0822007) and the "Fond européen de développement régional" (FEDER Asthme 1575-32168).

References

- [1] M. Wills-Karp, "Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness," *Annual Review of Immunology*, vol. 17, pp. 255-281, 1999.
- [2] F. D. Finkelman, S. P. Hogan, G. K. Khurana Hershey, M. E. Rothenberg, and M. Wills-Karp, "Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma," *Journal of Immunology*, vol. 184, no. 4, pp. 1663-1674, 2010.
- [3] A. Soussi-Gounni, M. Kontolemos, and Q. Hamid, "Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 107, no. 4, pp. 575-582, 2001.
- [4] S. L. Friend, S. Hosier, A. Nelson, D. Foxworthe, D. E. Williams, and A. Farr, "A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM⁺ B cells and produces a novel

- growth factor affecting B and T lineage cells," *Experimental Hematology*, vol. 22, no. 3, pp. 321–328, 1994.
- [5] A. Pandey, K. Ozaki, H. Baumann et al., "Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin," *Nature Immunology*, vol. 1, no. 1, pp. 59–64, 2000.
 - [6] L. S. Park, U. Martin, K. Garka et al., "Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 5, pp. 659–670, 2000.
 - [7] Y. Rochman, M. Kashyap, G. W. Robinson et al., "Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 45, pp. 19455–19460, 2010.
 - [8] W. J. Leonard, "Cytokines and immunodeficiency diseases," *Nature Reviews Immunology*, vol. 1, no. 3, pp. 200–208, 2001.
 - [9] V. Soumelis, P. A. Reche, H. Kanzler et al., "Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 7, pp. 673–680, 2002.
 - [10] S. Ying, B. O'Connor, J. Ratoff et al., "Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease," *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 4, pp. 2790–2798, 2008.
 - [11] A. Al-Shami, R. Spolski, J. Kelly et al., "A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4⁺ T cell development," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, no. 2, pp. 159–168, 2004.
 - [12] I. Rochman, N. Watanabe, K. Arima, Y. J. Liu, and W. J. Leonard, "Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4⁺ T cells," *Journal of Immunology*, vol. 178, no. 11, pp. 6720–6724, 2007.
 - [13] Z. Allakhverdi, M. R. Comeau, H. K. Jessup et al., "Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 2, pp. 253–258, 2007.
 - [14] Y. Nagata, H. Kamijuku, M. Taniguchi, S. Ziegler, and K. I. Seino, "Differential role of thymic stromal lymphopoietin in the induction of airway hyperreactivity and Th2 immune response in antigen-induced asthma with respect to natural killer T cell function," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 144, no. 4, pp. 305–314, 2007.
 - [15] C. K. Wong, S. Hu, P. F. Y. Cheung, and C. W. K. Lam, "Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and pro-survival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 43, no. 3, pp. 305–315, 2010.
 - [16] S. F. Ziegler and Y. J. Liu, "Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function," *Nature Immunology*, vol. 7, no. 7, pp. 709–714, 2006.
 - [17] Y. Rochman and W. J. Leonard, "The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8⁺ T cell homeostasis," *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 11, pp. 7699–7705, 2008.
 - [18] Y. Rochman and W. J. Leonard, "Thymic stromal lymphopoietin: a new cytokine in asthma," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 8, no. 3, pp. 249–254, 2008.
 - [19] S. F. Ziegler, "The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders," *Current Opinion in Immunology*, vol. 22, no. 6, pp. 795–799, 2010.
 - [20] H. Hammad, M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, R. N. Germain, and B. N. Lambrecht, "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 4, pp. 410–416, 2009.
 - [21] C. L. Sokol, G. M. Barton, A. G. Farr, and R. Medzhitov, "A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses," *Nature Immunology*, vol. 9, no. 3, pp. 310–318, 2008.
 - [22] T. Y. Halim, R. H. Krauss, A. C. Sun, and E. Takei, "Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation," *Immunology*, vol. 36, pp. 451–463, 2012.
 - [23] A. J. M. Van Oosterhout, D. Fattah, I. Van Ark, G. Hofman, T. L. Buckley, and F. P. Nijkamp, "Eosinophil infiltration precedes development of airway hyperreactivity and mucosal exudation after intranasal administration of interleukin-5 to mice," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 96, no. 1, pp. 104–112, 1995.
 - [24] P. Hachem, M. Lisbonne, M. L. Michel et al., "α-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role in IFN-γ," *European Journal of Immunology*, vol. 35, no. 10, pp. 2793–2802, 2005.
 - [25] J. R. Johnson, R. E. Wiley, R. Fattouh et al., "Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 169, no. 3, pp. 378–385, 2004.
 - [26] A. Trompette, S. Divanovic, A. Visintin et al., "Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein," *Nature*, vol. 457, no. 7229, pp. 585–588, 2009.
 - [27] L. Chambers, A. Brown, D. I. Pritchard, S. Sreedharan, K. Brocklehurst, and N. A. Kalsheker, "Enzymatically active papain preferentially induces an allergic response in mice," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 253, no. 3, pp. 837–840, 1998.
 - [28] K. Oboki, T. Ohno, N. Kajiura et al., "IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 18581–18586, 2010.
 - [29] M. Kashyap, Y. Rochman, R. Spolski, L. Samsel, and W. J. Leonard, "Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells," *The Journal of Immunology*, vol. 187, pp. 1207–1211, 2011.
 - [30] S. Lajoie, I. P. Lewkowich, Y. Suzuki et al., "Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 10, pp. 928–935, 2010.
 - [31] Y. H. Wang and M. Wills-Karp, "The potential role of interleukin-17 in severe asthma," *Current Allergy and Asthma Reports*, vol. 11, no. 5, pp. 388–394, 2011.
 - [32] B. Schnyder, S. Schnyder-Candrian, A. Pansky et al., "IL-17 reduces TNF-induced Rantes and VCAM-1 expression," *Cytokine*, vol. 31, no. 3, pp. 191–202, 2005.
 - [33] S. Schnyder-Candrian, D. Togbe, I. Couillin et al., "Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 12, pp. 2715–2725, 2006.
 - [34] A. G. Besnard, R. Sabat, L. Dumoutier et al., "Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 183, no. 9, pp. 1153–1163, 2011.
 - [35] C. Taube, C. Tertilt, G. Gyulveszi et al., "IL-22 is produced by innate lymphoid cells and limits inflammation in allergic airway disease," *PLoS ONE*, vol. 6, Article ID e21799, 2011.

- [36] Y. J. Liu, "Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 2, pp. 269–273, 2006.
- [37] H. J. De Heer, H. Hammad, T. Soullié et al., "Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, no. 1, pp. 89–98, 2004.
- [38] H. Hammad and B. N. Lambrecht, "Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses," *Allergy*, vol. 66, no. 5, pp. 579–587, 2011.
- [39] A. Joetham, K. Takeda, C. Taube et al., "Naturally occurring lung CD4⁺CD25⁺ T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta," *Journal of Immunology*, vol. 178, pp. 1433–1442, 2007.
- [40] J. Kearley, J. E. Barker, D. S. Robinson, and C. M. Lloyd, "Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is interleukin 10 dependent," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, no. 11, pp. 1539–1547, 2005.
- [41] A. O'Garra, F. J. Barrat, A. G. Castro, A. Vicari, and C. Hawrylowicz, "Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease," *Immunological Reviews*, vol. 223, no. 1, pp. 114–131, 2008.
- [42] S. J. Till, J. N. Francis, K. Nouri-Aria, and S. R. Durham, "Mechanisms of immunotherapy," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 113, no. 6, pp. 1025–1035, 2004.
- [43] Y. J. Liu, V. Soumelis, N. Watanabe et al., "TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation," *Annual Review of Immunology*, vol. 25, pp. 193–219, 2007.
- [44] S. F. Ziegler and D. Artis, "Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 4, pp. 289–293, 2010.
- [45] M. Wills-Karp and E. D. Finkelman, "Innate lymphoid cells wield a double-edged sword," *Nature Immunology*, vol. 12, pp. 1025–1027, 2011.
- [46] J. S. Lee, M. Cella, K. G. McDonald et al., "AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch," *Nature Immunology*, vol. 13, no. 2, pp. 144–151, 2012.

Asthme allergique induit par un allergène d'acarien, House Dust Mite (HDM): rôles de la caspase-1 et de la Protéine Kinase C thêta (PKC-θ)

Des études menées au laboratoire avaient démontré un rôle critique de l'inflammasome NLRP3 dans l'asthme allergique en réponse à l'ovalbumine en absence d'adjuvant. Mes travaux de thèse ont porté sur le rôle de NLRP3 et de la caspase-1 dans un modèle murin d'inflammation pulmonaire induite par l'allergène d'acarien HDM. Nous avons montré un rôle régulateur de la caspase-1 dépendant de l'inflammasome NLRP3 et la molécule adaptatrice ASC mais pas de l'inflammasome NLRC4. Cette régulation de la réponse allergique se caractérise par une augmentation de l'infiltration des éosinophiles, de l'hyperréactivité bronchique et de la production des cytokines de type Th2 telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-33 dans les poumons. Nous avons montré que les mécanismes responsables de cette régulation sont associés à l'IL-33 produite par les macrophages et que la neutralisation de l'IL-33 par administration locale de la protéine de fusion au récepteur ST2 (muST2-Fc) atténue les caractéristiques de l'asthme allergique. Ces résultats suggèrent que l'activation de la caspase-1 réduit la production d'IL-33 *in vivo* et régule ainsi la réponse l'inflammation pulmonaire induite par HDM et la réponse Th2.

D'autre part, nous nous sommes intéressés au rôle de la Protéine Kinase C thêta (PKC-θ) dans ce même modèle d'inflammation pulmonaire. Nous avons démontré que PKC-θ joue non seulement un rôle protecteur dans l'asthme allergique mais également un rôle critique pour la prolifération et l'activation des cellules lymphoïdes innées (ILC2). D'autre part, l'inhibition de PKC-θ *in vivo* par administration orale de son inhibiteur spécifique C20 (BIX02656) atténue l'inflammation pulmonaire et la production d'IL-5 et d'IL-13. Nous suggérons que PKC-θ est impliquée dans la différenciation des Th2 et des ILC2 via un mécanisme dépendant des facteurs de transcription IRF4 et NFAT-1. Au total, mes travaux de thèse mettent en exergue deux molécules IL-33 et PKC-θ qui pourraient constituer des cibles thérapeutiques potentielles.

Mots-clés : inflammation pulmonaire, asthme, HDM, NLRP3, caspase-1, IL-33, PKC-θ, ILC2

Allergic asthma induced by House Dust Mite allergen (HDM): roles of caspase-1 and Protein Kinase C theta (PKC-θ)

Studies from our laboratory have shown a critical role of NLRP3 inflammasome in response to ovalbumin allergen. In the present study we investigate the role of NLRP3 and caspase-1 in a mouse model of pulmonary inflammation induced by HDM. We have shown a regulatory role of caspase-1 dependant of the NLRP3 inflammasome and the adaptator molecule ASC but not NLRC4. The regulation of the allergic response is characterized by an increase of eosinophilia, bronchial hyperreactivity and Th2 cytokines production (IL-4, IL-5, IL-13 and IL-33) in lungs. We have shown that mechanisms responsible of this regulation are associated with IL-33 production by macrophages and that neutralization of IL-33 by local administration of a fusion protein of the ST2 receptor (muST2-Fc) reduce characteristics of asthma. These results suggest that caspase-1 activation reduce IL-33 production *in vivo* regulating lung inflammation and Th2 response induced by HDM.

Moreover, we investigate the role of the Protein Kinase C theta (PKC-θ) in allergic airway inflammation. We have demonstrated that PKC-θ plays a protective role in allergic asthma but is critical for the activation and proliferation of innate lymphoid cells (ILC2). In addition, *in vivo* inhibition by oral administration of PKC-θ specific inhibitor C20 (BIX02656) reduces pulmonary inflammation with IL-5 and IL-13 production. We suggest that PKC-θ is implicated in Th2 and ILC2 differentiation by a mechanism dependant on transcription factors IRF4 and NFAT-1. Finally, my thesis projects describe IL-33 and PKC-θ as potential therapeutic targets for allergic lung inflammation.

Keywords: lung inflammation, asthma, HDM, NLRP3, caspase-1, IL-33, PKC-θ, ILC2



Laboratoire d'Immunologie et de Neurogénétique
Expérimentales et Moléculaires
INEM, UMR-7355
3B, rue de la Férollerie, 45071 Orléans cedex 2

